

Aus der Inneren Medizin II,
Medizinische Klinik und Poliklinik
Universitätskliniken des Saarlandes
Homburg / Saar

**Erhöhte Expression des Interleukin-12-Rezeptors
bei M. Crohn und Induktion der IL-12-Rezeptor-Untereinheiten
durch kostimulatorische Moleküle**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2003**

vorgelegt von

Nicole Adrian

geb. am: 15.11.1974

in: Pirmasens

1. Tag der Promotion:

2. Dekan:

3. Berichterstatter:

Meiner Großmutter

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zusammenfassung / Summary	1-2
2.	Einleitung	3-13
2.1.	Krankheitsbilder.....	3
2.2.	Aspekte zur Krankheitsentstehung.....	5-13
2.2.1.	Umwelteinflüsse.....	5
2.2.2.	Genetische Faktoren.....	6
2.2.3.	Mikrobielle Faktoren.....	7
2.2.4.	Immunologische Faktoren.....	8-13
2.3.	Arbeitshypothese.....	13
3.	Material und Methoden	14-30
3.1.	Patienten.....	14
3.2.	Materialgewinnung.....	15
3.3.	Isolierung von Zellen.....	15-17
3.4.	Zellkulturen.....	17-20
3.5.	Molekularbiologische Analysen.....	21-26
3.6.	Immunzytochemische Tests.....	27-29
3.7.	Statistische Analysen.....	30
3.8.	Laborbedingungen.....	30
3.9.	Computersoftware.....	30
4.	Ergebnisse	31-42
4.1.	Expression der IL-12R- β 1- und IL-12R- β 2-Transkripte in nicht-entzündetem Darmgewebe der Kontrollgruppe.....	31-32
4.2.	Expression des IL-12R- β 1 und IL-12R- β 2 bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	32-38
4.3.	Induktion der IL-12R-Untereinheiten durch rhIL-12 und PHA.....	38-40
4.4.	Induktion von IL-12R- β 1- und IL-12R- β 2-Transkripten in LPMNC durch In-vitro-Kostimulation mit Anti-CD3-Antikörpern und B7.1-Molekülen.....	40-42
5.	Diskussion	43-48
6.	Literaturverzeichnis	49-67
7.	Dank	68
8.	Lebenslauf	69

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Ätiopathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist bis heute ungeklärt. Um das Verständnis diesbezüglich zu erweitern, wurde in dieser Arbeit die Expression des Interleukin-12-Rezeptors bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersucht.

Die Interleukin-12-Sekretion ist im Vergleich zur Colitis ulcerosa beim Morbus Crohn, als TH₁-dominante Erkrankung, erhöht. Die biologische Aktivität von IL-12 wird durch einen Rezeptor vermittelt, der aus zwei Untereinheiten, der β 1- und β 2-Kette, besteht. Da die Wirkung des IL-12 mit dessen Rezeptorexpression korreliert, wurde sowohl die Rezeptorketten-Expression auf mRNA- und Proteinebene, als auch die Induktionsmechanismen von IL-12R- β 1- und - β 2-Transkripten in mononukleären Zellen der Lamina propria und des peripheren Blutes von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa untersucht. Patienten mit einem kolorektalen Karzinom dienten als Kontrollgruppe.

Bei Patienten mit M. Crohn konnte im Vergleich zu Colitis ulcerosa-Patienten und zur Kontrollgruppe, ein erhöhtes Expressionsniveau beider IL-12-Rezeptorketten beobachtet werden. In-vitro-Stimulationen mononukleärer Zellen der Lamina propria mittels Cross-Linking durch Anti-CD3-Antikörpern in Anwesenheit einer B7.1-positiven bzw. -negativen Maus-Ltk⁻ Zelllinie, zeigten eine Erhöhung der IL-12R- β 1-Transkripte, die sich als unabhängig von einer B7.1-Kostimulation erwies. Im Gegensatz dazu, konnte eine signifikante Steigerung von IL-12R- β 2-Transkripten nur durch Kostimulation mit Anti-CD3-Antikörpern und B7.1 induziert werden.

Die vorliegenden Daten unterstützen die vorherrschende Meinung einer lymphozytären TH₁-Dominanz beim M. Crohn. Die erhöhte Expression des IL-12R- β 2 in entzündeter Mukosa bei Patienten mit M. Crohn kann ein Ergebnis der Kostimulation durch B7.1-Moleküle sein. Das Modulieren oder selektive Inhibieren der IL-12R β 2-Expression auf mononukleären Zellen der Lamina propria könnte somit einen neuen Therapieansatz in der Behandlung des M. Crohn darstellen.

1. SUMMARY

The pathogenesis of inflammatory bowel disease is still unclarified. In regard to enlarge our knowledge, the expression of the interleukin-12 receptor was investigated in patients with inflammatory bowel disease.

The interleukin-12 secretion is increased in Crohn`s disease compared to ulcerative colitis. Its biological activity is mediated through a high-affinity receptor, which is composed of two subunits, $\beta 1$ and $\beta 2$. Since IL-12 responsiveness correlates with its receptor expression, receptor expression of IL-12R $\beta 1$ and - $\beta 2$ was analysed at mRNA and protein level in lamina propria mononuclear cells and peripheral blood lymphocytes of patients with inflammatory bowel disease, as well as mechanisms of induction for both receptor transcripts. Patients with colorectal cancer served as control.

The expression for both receptor subunits were increased in inflamed specimens of patients with Crohn`s disease but not in ulcerative colitis and controls, respectively. To investigate the role of costimulatory molecules, lamina propria mononuclear cells were stimulated by cross-linking of anti-CD3 antibodies, in presence or absence of B7.1-transfected mouse-Ltk⁻-cells. In-vitro stimulation of lamina propria lymphocytes with anti-CD3-antibodies resulted in an increase of IL-12R $\beta 1$ transcripts independant of B7.1-mediated costimulation. Whereas anti-CD3 stimulation alone resulted only in a slightly increase of IL-12R $\beta 2$ transcripts, a distinct accumulation of IL-12R $\beta 2$ mRNA could be induced after anti-CD3/B7.1-costimulation.

The data of this investigation support the predominance of TH₁ cells in Crohn`s disease. The increased expression of IL-12R $\beta 2$ subunit in lamina propria lymphocytes of patients with Crohn`s disease may be a result of B7.1-costimulation. Therefore, the modulation or selective inhibition of IL-12R $\beta 2$ expression on lamina propria mononuclear cells could be a new therapeutic approach in Crohn`s disease.

2. EINLEITUNG

Unter dem Begriff “Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)” werden der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa zusammengefasst, wobei die Ätiologie dieser Darmerkrankungen bislang ungeklärt ist.

2.1. Krankheitsbilder

2.1.1. Morbus Crohn (Enterocolitis regionalis, Ileitis terminalis)

Der M. Crohn ist eine diskontinuierlich, segmental auftretende, transmurale Entzündung der Darmschleimhaut. Prinzipiell kann der gesamte Gastrointestinaltrakt, vom Mund bis zum Anus betroffen sein, wobei die bevorzugte Lokalisation im terminalen Ileum und Colon liegt. Makroskopisch imponiert diese Erkrankung als segmentale Entzündung aller Wandschichten, mit ödematöser und fibrotischer Verdickung der Darmwand unter Ausbildung segmentaler Stenosen, sowie entero-enteraler und entero-cutaner Fistelbildung. Histopathologisch ist der M. Crohn durch eine fokale transmurale Entzündung mit typischen, jedoch nicht obligaten Epitheloidzellgranulomen mit mehrkernigen Riesenzellen charakterisiert. In vielen Fällen zeigt sich des Weiteren eine Hyperplasie der zugehörigen mesenterialen Lymphknoten. Klinisch äußert sich der M. Crohn durch abdominelle Schmerzen, häufig im rechten Unterbauch und schleimige Durchfälle, meist ohne Blutbeimengungen. An intestinalen Komplikationen stehen vor allem Darmstenosen, Fisteln und anorektale Abszesse im Vordergrund. Häufig kann man auch extraintestinale Symptome beobachten. An den Augen findet sich nicht selten eine Uveitis und Episkleritis, an der Haut ein Erythema nodosum und an Gelenken finden sich häufig arthritische Veränderungen

2.1.2. Colitis ulcerosa

Die Colitis ulcerosa ist eine chronisch-entzündliche Dickdarmerkrankung der oberflächlichen Schleimhautschichten. Typischerweise liegt hier ein kontinuierliches Ausbreitungsmuster vor. Die Erkrankung beginnt meist distal im Rektum und breitet sich nach proximal im Colon aus, wobei der Befall des Rektums jedoch nahezu obligat ist. Je nach Ausdehnung des Befundes unterscheidet man eine "Proktitis ulcerosa", die nur das Rektum betrifft, eine "Distale Colitis", bei der das Rektum und Sigma betroffen sind, eine "Linksseiten-Colitis", bei der die Entzündung bis ins Colon transversum reicht und eine "Pancolitis", bei der das gesamte Colon betroffen ist. Makro- und Histopathologisch muss ein akutes von einem chronisch fortgeschrittenen Stadium unterschieden werden. Im akuten Stadium findet man eine entzündlich gerötete Schleimhaut mit kleinen Schleimhautulzerationen, die ödematös verquollen erscheint und bei Kontakt blutet. Histologisch überwiegen Granulozyteninfiltrate in Form von Kryptenabszessen. Das fortgeschrittene Stadium ist durch die Schleimhautatrophie gekennzeichnet. Die chronisch-rezidivierenden Ulzerationen führen zur Zerstörung der Schleimhaut mit Verlust des physiologischen Reliefs, wobei die restlichen Schleimhautinseln als "Pseudopolypen" erscheinen. Die Histologie ist durch ein Infiltrat aus Lymphozyten und Histiocyten gekennzeichnet. Je nach Dauer der Erkrankung sind auch hier Epithelzell dysplasien erkennbar, die ein erhöhtes Karzinomrisiko darstellen. Klinisch manifestiert sich die Colitis ulcerosa durch abdominelle Schmerzen und blutig-schleimige Durchfälle, die zu massiven Blutverlusten führen können. Als weitere intestinale, lebensbedrohliche Komplikation ist besonders die Entwicklung eines sog "Toxischen Megakolons" hervorzuheben. Extraintestinale Komplikationen an Augen, Haut und Gelenken kommen auch bei der Colitis ulcerosa vor, sind jedoch wesentlich seltener als beim M. Crohn.

Beiden Erkrankungen gemeinsam sind die chronische Entzündung der intestinalen Mukosa, der chronisch-rezidivierende Verlauf mit akuten spontanen Exazerbationen und Remissionen unterschiedlicher Dauer.

2.2. Aspekte zur Krankheitsentstehung

In den letzten Jahren sind viele Theorien bezüglich Ätiologie und Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konzipiert und erforscht worden. Man muss davon ausgehen, dass es sich um eine multifaktorielle Genese handelt. Bisweilen ist auch unklar, ob beiden Erkrankungen eine gemeinsame oder unterschiedliche Ätiologie zugrunde liegt.

Die ätiopathologischen Konzepte der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen lassen sich in folgende Gruppen einteilen:

1. Umweltfaktoren
2. Genetische Faktoren
3. Mikrobielle Ursachen
4. Immunologische Faktoren

2.2.1. Umwelteinflüsse

In der großen Vielfalt pathogenetischer Faktoren stellt der Einfluss der Umwelt eines der am wenigsten verstandenen Gebiete dar. Verschiedene Daten zeigen jedoch an, dass Umweltfaktoren in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine große Bedeutung zukommt.

Zu den wichtigsten beeinflussenden Umweltfaktoren gehören unter anderem pränatale Gegebenheiten, Fütterung mit Muttermilch, Kinderkrankheiten, Hygiene, Ernährung, orale Kontrazeptiva, Rauchen, Stressfaktoren, Kontakt mit Tieren und sportliche Aktivitäten [KOUTROBAKIS et al, 1996]. Unter den genannten Faktoren stellt der Tabakkonsum wohl einer der am besten erforschten Umwelteinflüsse dar, wobei insbesondere eine Assoziation mit M. Crohn vorliegt [HARRIES et al, 1982; LOGAN et al., 1984; REIF et al, 1995]. Ein weiterer Aspekt stellt die Ernährung dar. Einige Arbeitsgruppen zeigten, dass durch eine spezielle Diät bei Patienten mit Morbus Crohn eine Remission erreicht werden kann [O'MORAIN et al, 1984]. Obwohl die Untersuchungen auf dem weiten Forschungsgebiet der Umwelteinflüsse enorm forciert werden, sind die exakten pathophysiologischen Mechanismen unklar.

2.2.2. Genetische Faktoren

Viele Studien zeigen eine genetische Disposition zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auf. Das Risiko an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung zu leiden, kann bei Verwandten 1. Grades bis zu 40% betragen, wobei das Risiko bei M. Crohn höher zu sein scheint, als bei Colitis ulcerosa [FIOCCHI, 1998]. Neben familiären Häufungen wurde auch eine höhere Konkordanz bei monozygoten Zwillingen im Vergleich zu dizygoten beobachtet [TYSK et al, 1988].

Ethnische Untersuchungen weisen auf unterschiedliche Inzidenzen bei verschiedenen Rassen hin. In einer frühen randomisierten Studie konnte in einer europäischen Population die Häufung von HLA-A11 und HLA-A7 bei Patienten mit Colitis ulcerosa und ein vermindertes Vorkommen von HLA-A9 bei Morbus Crohn-Patienten beobachtet werden [ASQUITH P. et al, 1974]. Bei japanischen Patienten mit Colitis ulcerosa besteht eine Assoziation mit HLA-DR2 [ASAKURA et al, 1982], die sich bei kaukasischen Patienten nicht bestätigte.

Des Weiteren vermutet man, dass die Heterogenität und Prognose der Erkrankung unter anderem auf Polymorphismen und Mutationen in Genen zurückzuführen ist, die in immunologische Prozesse involviert und regulatorisch an Entzündungsreaktionen beteiligt sind [MURILLO et al, 2002]. Darunter ist vor allem CARD15 (früher: NOD2) hervorzuheben [HUGOT et al, 1996]. Dieses Gen codiert für ein Protein, welches von peripheren Monozyten exprimiert wird. Insbesondere drei verschiedene CARD15-Mutationen konnten bei M. Crohn-, jedoch nicht bei Colitis ulcerosa-Patienten identifiziert werden [HAMPE et al, 2001, HUGOT et al, 2001, OGURA et al, 2001]. Diese Mutationen bewirken eine C-terminale Trunkierung der NOD2-Proteine, wodurch eine veränderte Bindung von intrazellulären Endotoxinen entsteht, die eine verstärkte Aktivierung des Transkriptions-Faktors NF- κ B initiieren und schließlich in einer gesteigerten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-12 mündet [CHARLES et al., 2002]. Ob sich die Mutationen in ihrem klinischen Erscheinungsbild unterscheiden, muss noch geklärt werden.

2.2.3. Mikrobielle Faktoren

Seit der Entdeckung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen werden, neben genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen, Mikroorganismen als auslösende Agenzien diskutiert.

Für den Morbus Crohn wird schon seit Jahren eine Assoziation mit Mykobakterien postuliert [CHIODINI et al., 1984]. Bei einigen M. Crohn-Patienten konnten auch im Serum erhöhte Antikörper-Titer gegen Mykobakterium paratuberculosis nachgewiesen werden [THAYER et al., 1984]. Ein eindeutiger Beweis für die mykobakterielle Ätiopathogenese des Morbus Crohn konnte jedoch bislang nicht erbracht werden. Dennoch wird der Zusammensetzung der autologen, luminalen mikrobiellen Flora eine bedeutende Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung entzündlicher Läsionen beigemessen. Dies wird sowohl durch experimentelle, als auch durch klinische Beobachtungen unterstützt. Durch Zusammenbruch der mukosalen Barriere kommt es vermutlich zum Influx verschiedenster luminaler Antigene, wodurch der chronische Entzündungsprozess unter Einbeziehung immunkompetenter Zellen der Lamina propria aufrechterhalten wird [STALLMACH et al., 2002]. Durch neuere molekularbiologische Techniken konnten kürzlich signifikante qualitative und quantitative Unterschiede in der Zusammensetzung der intestinalen Flora bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollen festgestellt werden. Bei M. Crohn-Patienten wurden erhöhte luminale Konzentrationen von Bakterien der Gruppe Bacteroides, Eubacteria und Peptostreptococcus gemessen, während die Besiedelung mit Bifido-Bakterien deutlich erniedrigt ist. Bei Colitis ulcerosa Patienten scheint die Besiedelung mit fakultativen Anaerobiern vorherrschend zu sein [LINSKENS et al., 2001].

Neben Bakterien werden von einigen Autoren Viren, insbesondere der Masern-Virus, mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Zusammenhang gebracht. So wurde beobachtet, dass die perinatale Exposition mit dem Masern-Virus das Risiko an Morbus Crohn zu erkranken, deutlich erhöht [EKBOM et al., 1994]. Auch die Masern-Vakzine soll ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung darstellen [THOMPSON et al., 1995], wobei diese Beobachtungen heftig umstritten sind.

2.2.4. Immunologische Faktoren

Es existieren viele Hinweise, dass verschiedene immunologische Phänomene eine zentrale Rolle in der Pathogenese des M. Crohn und der Colitis ulcerosa spielen [PODOLSKY, 1991, MACDERMOTT et al., 1988]. Obgleich einige immunologische Störungen sowohl beim M. Crohn, als auch bei der Colitis ulcerosa zu finden sind, gibt es verschiedene wichtige Gesichtspunkte, die einen unterschiedlichen Weg in der immunologisch vermittelten intestinalen Entzündung beider Erkrankungen widerspiegeln. Die Pathophysiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist vor allem durch die Entwicklung einer zellulär vermittelten Immunantwort gekennzeichnet [ZEITZ, 1997], wobei insbesondere Makrophagen und von T-Zellen sezernierte Zytokine den Mittelpunkt in der Ausdehnung und Aufrechterhaltung des inflammatorischen Prozesses einnehmen [SARTOR, 1994]. Während bei der Colitis ulcerosa eine TH₂-assoziierte Immunantwort vorliegt [LAKATOS, 2000], spielen aktivierte TH₁-Zellen in der Pathogenese des Morbus Crohn eine zentrale Rolle [FIOCCHI, 1998]. Dies gilt insbesondere für die Entwicklung granulomatöser Läsionen [BREESE et al., 1993, FUSS et al., 1996].

2.2.4.1. TH1- und TH2-Zellen

CD4⁺-T-Helferzellen stellen das Hauptkontrollelement in der adaptiven Immunantwort dar. Diese wird durch mindestens zwei verschiedene Subpopulationen von CD4-positiven T-Lymphozyten beeinflusst, den so genannten TH₁- und TH₂-Zellen, [MOSMANN et al, 1989]. Phänotypisch können diese nicht voneinander differenziert werden; sie unterscheiden sich jedoch in ihrem Zytokinmuster. TH₁-Zellen produzieren Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2) und Tumor-Nekrose-Faktor- β (TNF- β), während TH₂-Zellen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 sezernieren [ROMAGNANI, 1999]. Die Differenzierung naiver T-Zellen zu TH₁- respektive TH₂-Zellen hat einen entscheidenden Einfluss auf die resultierende Immunantwort [THOMPSON, 1995].

2.2.4.1.1. Effektorfunktionen von TH1- und TH2-Zellen

Das Haupteffektor-Zytokin von TH₁-Zellen stellt IFN- γ dar; es induziert ~ 400 verschiedene Gene, u.a. aktiviert es Makrophagen und stimuliert die Produktion von Antikörpern der Klasse IgG, die an der Opsonierung und Phagozytose von mikrobiellen Partikeln durch Makrophagen beteiligt sind. TNF- β und IFN- γ rekrutieren und aktivieren Leukozyten. Des Weiteren fördert der Synergismus von IL-2 und IFN- γ die Differenzierung von CD8⁺-T-Lymphozyten zu zytotoxischen Zellen [ABBAS et al., 1996]. Die wichtigsten Effektor-Zytokine von TH₂-Zellen sind IL-4 und IL-5. Interleukin-4 nimmt die Schlüsselfunktion in der IgE-vermittelten Mastzell-Degranulation ein [GALLI, 1993], während IL-5 das bedeutendste Zytokin für die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten darstellt [WARDLAW et al., 1995]. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass verschiedene Zytokine, die von TH₂-Zellen sezerniert werden, anti-inflammatorisches Potential zeigen: IL-4 und IL-13 antagonisieren die durch IFN- γ induzierte Makrophagenaktivierung und IL-10 unterdrückt zahlreiche Makrophagen-Aktionen. Dies lässt vermuten, dass TH₂-Zellen nicht nur Effektorfunktionen besitzen, sondern auch regulatorisch in die Immunantwort eingreifen [ABBAS et al., 1996]. Zusammenfassend kann man sagen, dass je nach Induktion einer der beiden Phänotypen, sich die daraus resultierende Immunantwort in eine unterschiedliche Richtung entwickelt: TH₁-Zellen aktivieren durch ihre Zytokine Makrophagen und sind verantwortlich für die zelluläre Immunität, während TH₂-Zellen neben einer starken Antikörper-Produktion und einer Aktivierung von eosinophilen Granulozyten, eine Phagozyten-unabhängige Immunantwort induzieren und somit den humoralen Teil des Immunsystems unterstützen [OPENSHAW et al., 1995, ROMAGNANI, 1995].

2.2.4.1.2. Induktion der T-Helfer-Subpopulationen

Die genauen Mechanismen, die zur Induktion von TH1- oder TH2-Zellen bei der Immunantwort führen, sind noch nicht vollständig verstanden. Es ist jedoch bekannt, dass beide Untergruppen von der gleichen Vorläuferzelle abstammen, einer naiven CD4⁺-T-Zelle. Deren Differenzierung in TH1- oder TH2-Zellen wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst: Neben der Antigen-Menge [PFEIFFER et al., 1995, SECRIST et al., 1995] und dem Typ der Antigenpräsentierenden Zelle [GAJEWSKI et al., 1991, CHANG et al., 1990],

lenken Zytokine, als potenteste Stimuli, die Differenzierung in die eine oder die andere Richtung [SEDER et al., 1994].

Interleukin-12 (IL-12) ist das bedeutendste Zytokin zur Induktion von TH₁-Zellen, wobei die Signaltransduktion über die Phosphorylierung und Aktivierung von STAT-Molekülen (signal transducers and activators of transcription) vermittelt wird [IHLE, 1996]. Obwohl IL-12 STAT1, STAT3 und STAT4 aktivieren kann, ist die Differenzierung in TH₁-Zellen vor allem STAT4-abhängig [JACOBSON et al., 1995, BACON et al., 1995]. Auch IFN- γ , welches durch IL-12 induziert wird, ist an der Differenzierung von TH₁-Zellen beteiligt. Einerseits erhöht es die IL-12-Sekretion durch Makrophagen, andererseits unterstützt es die Expression eines funktionsfähigen IL-12-Rezeptors (IL-12R) auf T-Zellen [TRINCHIERI, 1994]. Die Differenzierung naiver CD4⁺-Vorläuferzellen zu TH₂-Zellen wird durch IL-4 induziert [SEDER et al., 1994], wobei die Signalweiterleitung hierbei über STAT6 erfolgt [HOU et al., 1996, RYAN et al., 1996].

Ein weiterer wichtiger Faktor, der die T-Zellaktivierung und -differenzierung beeinflusst, ist die Expression akzessorischer Moleküle. Es hat sich gezeigt, dass vor allem die beiden strukturell verwandten kostimulatorischen Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), durch Interaktion mit ihren Rezeptoren CD28 und CTLA4, in der Lage sind, T-Zellen zu aktivieren und deren Differenzierung zu beeinflussen [KUCHROO et al., 1995].

2.2.4.2. Interleukin 12 (IL-12) und dessen Rezeptor

Interleukin 12 nimmt die zentrale Rolle in der Induktion von TH₁-Zellen und somit in der zellulär vermittelten Immunantwort ein [HSIEH et al., 1993, MANETTI et al. 1993, IHLE, 1996, STERN et al, 1996, MAGRAM et al., 1996]. Es stimuliert die antigen- und mitogen-induzierte Proliferation von T- und NK-Zellen [STERN et al., 1990, WOLF et al., 1991, GATELY et al., 1991] und erhöht die lytische Aktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten [STERN et al, 1990, CHOUAIB et al., 1994]. IL-12 wurde von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen entdeckt. Die erste Arbeitsgruppe vom Genetics Institute, Massachusetts identifizierte IL-12 erstmals als NKSF (NK cell stimulatory factor) [KOBAYASHI et al., 1989], während ein Jahr später der CLMF (cytotoxic lymphocyte maturation factor) entdeckt

wurde [STERN et al., 1990]. Nach Proteinreinigung und molekularbiologischen Analysen, hat sich jedoch gezeigt, dass NKSF und CLMF identisch sind und schließlich die gemeinsame Bezeichnung IL-12 gewählt wurde [GUBLER et al., 1991, WOLF et al., 1991]. Interleukin-12 ist ein heterodimeres Zytokin [BRUNDA et al., 1994, TRINCHIERI et al., 1994, WOLF et al., 1994]. Es besteht aus zwei N-glykosylierten Polypeptidketten, mit einem Molekulargewicht von 35 kD (IL-12p35) respektive 40 kD (IL-12p40), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind [WOLF et al., 1991]. Durch Interaktion des CD40-Liganden (CD154, gp39), ein 33 kD Glykoprotein, welches auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen exprimiert wird [BANCHEREAU et al., 1994, FOY et al., 1996], mit dessen Rezeptor CD40, der auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen lokalisiert ist, werden vor allem Makrophagen/Monozyten [D'ANDREA et al., 1992] und dendritische Zellen [HEUFLE et al., 1996, MACATONIA et al., 1995] zur IL-12-Sekretion angeregt. Um seine biologische Aktivität zu entfalten, agiert IL-12 via spezifischen membrangebunden Rezeptoren, die eine limitierte Verteilung auf aktivierten T-Zellen und NK-Zellen aufweisen [DESAI et al., 1992].

Ein funktionsfähiger IL-12-Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, dem IL12R- β 1, mit einem Molekulargewicht von 100 kD und der β 2-Untereinheit mit 130 kD [PRESKY et al., 1996, STERN et al., 1996, GATELY et al., 1998]. Beide Untereinheiten gehören zur Hämopoietin-Rezeptor-Superfamilie und zeigen eine deutliche Homologie zu gp130, der β -Untereinheit verschiedener Zytokin-Rezeptoren, und dem Rezeptor für G-CSF (granulocyte-stimulatory factor) und LIF (leukemia-inhibitory factor) [CHUA et al., 1994, PRESKY et al., 1996]. Wie bei anderen Mitgliedern der Hämopoietin-Rezeptor Superfamilie, spielen bei der IL-12-vermittelten Signaltransduktion Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinasen eine wichtige Rolle. Nach der Rezeptorbindung von IL-12 resultiert eine Aktivierung der JAK2- und Tyk2-Kinase, gefolgt von einer Tyrosin-Phosphorylierung und Aktivierung von STAT4, wodurch die Differenzierung in TH₁-Zellen induziert wird [BACON et al., 1995, JACOBSON et al., 1995]. Die für die Induktion der zytoplasmatischen Transkriptionsfaktoren notwendigen Tyrosin-Reste sind nur in der intrazellulären Domäne der IL-12R- β 2-Kette vorhanden und fehlen im IL-12R- β 1 [YAO et al., 1999, VAN RIETSCHOTEN et al., 2000]. Sowohl in humanen, als auch in experimentellen Modellen hat sich gezeigt, dass nur TH1-Zellen auf IL-12 reagieren können, während TH2-Zellen diese Eigenschaft nicht besitzen, wobei dieses Phänomen auf die unterschiedliche Expression der Rezeptor-Untereinheiten in den beiden Subpopulationen zurückzuführen ist; während TH1-Zellen beide Untereinheiten exprimieren

(IL-12R- β 1 und IL-12R- β 2), können TH2-Zellen nur IL-12R- β 1 exprimieren [SZABO et al., 1997, ROGGE et al., 1997]. Somit muss man vermuten, dass die β 2-Kette für die Signalübermittlung von Interleukin-12 verantwortlich ist [CHANG et al., 1990] und folglich das Gleichgewicht zwischen TH1- und TH2-Zytokinen durch die Höhe der IL-12R- β 2-Expression reguliert wird [ZHANG et al., 1999, ROGGE et al., 1999].

2.2.4.3. T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung durch akzessorische Moleküle

Damit körperfremdes Antigen eine spezifische T-Zell-Stimulierung induzieren kann, muss dessen molekulare Konfiguration eine Bindung in prozessierter Form an MHC-(major histocompatibility complex)-Klasse-I- oder -II-Moleküle bewirken. Beide MHC-Molekülklassen, die durch Präsentation der eingebetteten Antigene eine Schlüsselrolle bei Reaktionen der Immunerkennung einnehmen, werden von den verschiedenen T-Zellen erkannt und somit stimuliert. Während CD8⁺-T-Zellen Antigene in Verbindung mit MHC-I erkennen, werden CD4⁺-T-Zellen via MHC-II stimuliert. Innerhalb der MHC-Klassen existieren verschiedene Gruppen unterschiedlicher Antigenspezifität, wodurch ausschließlich T-Zellen der gleichen Gruppenantigenspezifität zur Erkennung des MHC-Moleküls befähigt sind. Aufgrund dieser MHC-Restriktion kann daher lediglich ein Bruchteil des Effektorpools rekrutiert werden. Zur Antigenerkennung müssen die Protein/MHC-Komplexe dem T-Zellrezeptor (TCR) in einer ausreichenden Konzentration an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen dargeboten werden. Sowohl bei T-Helferzellen, als auch bei zytotoxischen T-Zellen sind die TCR mit einem Molekülkomplex aus nicht-kovalent gebundenem Transmembranpolypeptiden (CD3) assoziiert. Diese CD3-Untereinheit übernimmt die aktivierende Signaltransduktion ins Zellinnere, sobald die MHC-restringierte Bindung des Antigens an den TCR erfolgt ist.

Zur optimalen lymphozytären Stimulation ist jedoch ein zweites Signal unerlässlich, welches als Rezeptor-Ligand-Interaktion erfolgt, jedoch nicht zwingend antigenspezifisch sein muss [BRETSCHER et al., 1970]. Die effektivste Koaktivierung bei einer anti-CD3-induzierten T-Zell-Proliferation wurde nach einer zusätzlichen Gabe von anti-CD28-Antikörpern gemessen [THOMPSON et al., 1989]. Das homodimere CD28-Glykoprotein ist auf etwa 80% der peripheren T-Lymphozyten vorhanden und steigert im Zusammenwirken mit dem TCR/CD3-Komplex die Sekretion zahlreicher Zytokine, in erster Linie IL-2, und die Proliferation naiver

T-Zellen [JUNE et al., 1990, SCHWARTZ, 1992]. Die natürlichen Liganden von CD28 sind die B7-Glykoproteine, B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die, neben anderen, nach Rezeptor-Ligand-Vernetzung kostimulatorisch wirksamen Molekülen wie ICAM-1 (CD54), LFA-3 (CD58) und VCAM-1 [DAMLE et al., 1992, DENNIG et al., 1994], auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen exprimiert werden [LINSLEY et al., 1990, JUNE et al., 1994] und der Immunglobulin-Gene-Superfamilie zugehörig sind [FREEMAN et al., 1989]. Abgesehen von einer initialen Aktivierung ungeprägter, nicht-stimulierter T-Zellen, sind diese akzessorischen Moleküle, insbesondere B7.1 und B7.2, neben Zytokinen in großem Umfang in die Differenzierung aktivierter CD4⁺-T-Helferzellen zu TH₁- bzw. TH₂-Zellen involviert [THOMPSON et al., 1989]. Während die Kostimulation B7.1/CD28 ein TH₁-assoziiertes Zytokinprofil induziert, wird durch die Interaktion von CD28 mit seinem Liganden B7.2 eine Differenzierung antigen-stimulierter T-Zellen zum TH₂-Phänotyp hin beobachtet [THOMPSON, 1995, KUCHROO et al., 1995, FREEMAN et al., 1995, MATULONIS et al., 1996]. Darüber hinaus unterscheiden sich beide in ihrer Bindungseigenschaft zu CD28 und dem Zeitpunkt ihres Auftretens während der Initiation einer Immunantwort; B7.2 erscheint wesentlich früher auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen als B7.1 und zeigt eine geringere Bindungsaffinität [TAYLOR-ROBINSON et al., 1998].

2.3. Arbeitshypothese

Um das Verständnis in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu erweitern, wurde in dieser Arbeit die Expression der Untereinheiten des Interleukin-12-Rezeptors an mononukleären Zellen der Lamina propria bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa untersucht und mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Aufgrund oben genannter Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass der M. Crohn, als TH₁-assoziierte Erkrankung, im aktiven Stadium mit einer erhöhten Expression der IL-12R-β2-Untereinheit einhergeht, die bei Colitis ulcerosa, als TH₂-dominante Erkrankung und in gesundem, nicht entzündetem Gewebe nicht zu beobachten sein soll. Darüber hinaus wurde das kostimulatorische Potential von CD28, durch Interaktion mit seinem Liganden B7.1, bezüglich des Induktionsvermögens von IL-12R-Transskripten an T-Lymphozyten der Lamina propria in vitro untersucht.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Patienten

Für diese Arbeit wurde ein Kollektiv von insgesamt 40 Patienten zur Untersuchung von mononukleären Zellen der Lamina propria und von mononukleären Zellen des peripheren Blutes herangezogen.

Das Patientenkollektiv umfasste 12 Patienten mit Morbus Crohn (Alter: 21 bis 49 Jahre), 9 Patienten mit Colitis ulcerosa (Alter: 32 bis 55 Jahre) und 14 Patienten mit kolorektalem Karzinom (Alter: 43 bis 72 Jahre). Diese Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme in stationärer Behandlung der Chirurgischen Abteilung der Universitätskliniken des Saarlandes. Die Lymphozyten wurden, nach schriftlichem Einverständnis der Patienten aus Darmgewebe isoliert, das durch eine chirurgische Resektion gewonnen wurde.

Alle Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung hatten zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme einen akuten Schub ihrer Erkrankung und waren mit 5-ASA (5-Aminosalicylsäure) und Kortikosteroiden für mindestens 3 Monate vorbehandelt, wobei zwei Patienten zusätzlich Azathioprin als immunsuppressive Therapie erhalten hatten. Die Patienten mit kolorektalen Karzinomen dienten als gesunde Kontrollgruppe. Nach chirurgischer Entfernung des tumorbefallenen Darmabschnittes wurden bei diesen Patienten Gewebestrecken entnommen, die nicht-entzündlich verändert waren.

Des Weiteren wurden 5 gesunde Blutspender für diese Studie herangezogen. Diese Proben stammten von Angestellten der Universitätskliniken des Saarlandes, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme, nach betriebsärztlicher Untersuchung als gesund galten und keinerlei Medikamente einnahmen. Die Blutentnahme erfolgte auch bei diesen Spendern nur nach schriftlichem Einverständnis.

3.2. Materialgewinnung

Direkt im Anschluss an die chirurgische Resektion wurden die Resektate einer makroskopischen Beurteilung unterzogen. Anhand verschiedener Entzündungskriterien, wie Mukosafarbe, Ulzerationen, Eiterbeläge, Fibrinbeläge, Fibrosierung, Stenosierung und Pseudopolypenbildung, wurden die Abschnitte in entzündlich bzw. nicht-entzündlich verändert eingeordnet. Die entsprechenden Darmabschnitte wurden entnommen und sofort in eine 0,9%ige Kochsalzlösung gebracht. Direkt im Anschluss wurde das Gewebe, wie in 3.3.1. beschrieben, aufgearbeitet. Neben der makroskopischen Beurteilung wurde auch eine mikroskopisch-histologische Begutachtung durch Frau Dr. med. Müller-Molaian im Pathologischen Institut der Universitätskliniken des Saarlandes durchgeführt. Es erfolgte die Klassifikation und Sicherung der chronisch entzündlichen Darmerkrankung als Morbus Crohn bzw. als Colitis ulcerosa.

3.3. Isolierung von Zellen

3.3.1. Isolierung von intestinalen mononukleären Zellen der Lamina propria aus Resektaten

Zu Beginn wurden die bei der chirurgischen Resektion gewonnenen Gewebestücke dreimal in PBS (Merck, Darmstadt) (4°C) gewaschen, um darauf verbliebene Stuhlreste und Blutkoagel zu entfernen. Danach wurde das Darmgewebe auf einer sterilen Unterlage aufgespannt und die Lamina propria von den anderen Darmschichten getrennt. Um den verbliebenen Schleim zu entfernen, wurde die Mukosa für 15 Minuten bei 37°C auf einem Orbitalschüttler in einer Calcium- und Magnesiums-Freien Hanks balanced salt solution, (HBSS, PAA laboratories GmbH, Linz, Österreich), pH 7.4, die zusätzlich 1mM DTT (Dithiotreitol; Sigma, Deisenhofen), 100 U/ml Penicillin (Hoechst, Frankfurt a. M.), 100µg/ml Streptomycin (Biochrom, Berlin), 50µg/ml Gentamicin (Biochrom, Berlin), 2,5µg/ml Amphotericin B (Boehringer, Mannheim), 25mM HEPES und 0,05 mM 2-β-Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg) enthielt, inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde der Überstand verworfen und die Mukosa solange in HBSS (ohne Zusätze) pH 7.4, gewaschen, bis der Überstand klar

erschien. Im Anschluss wurde die Mukosa dreimal eine Stunde bei 37°C mit der oben beschriebenen HBSS-Lösung, die nun anstatt DTT 2mM EDTA enthielt, auf einem Orbitalschüttler bei 37°C inkubiert. Nach der EDTA-Inkubation wurde die Mukosa mehrmals in HBSS (ohne Zusätze) pH 7.4, gewaschen und die verbliebene Mukosa über Nacht auf einem Orbitalschüttler in Kollagenasemedium (RPMI 1640 (Life Technologies, Karlsruhe), 10% Fetales Kälberserum, 4mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin), 0,05mg/ml Gentamicin (Biochrom, Berlin), 2,5µg/ml Amphotericin B (Boehringer, Mannheim), 0,025 M HEPES pH 7.3, 5×10^6 M β -Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg), 200 U/ml DNase I (Roche, Mannheim), 14 U/ml Kollagenase CSL III (Biochrom, Berlin), 100 U/ml Soybean Trypsininhibitor (Sigma, Deisenhofen), bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Suspension mehrmals durch eine 50ml Perfusorkanüle passagiert und durch ein 70µm Nylonzellsieb (Becton Dickinson, Heidelberg) in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen) gegeben, um die unverdauten Mucosareste zu entfernen. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation (360g für 10 Minuten). Um nun weitere Schleimreste zu entfernen, wurde das Pellet in Waschmedium (RPMI 1640 (Life Technologies; Karlsruhe), 10% Fetales Kälberserum, 0,05mg/ml Penicillin (Hoechst, Frankfurt a. M.), 0,05 mg/ml Streptomycin (Biochrom, Berlin), 0,01M HEPES pH 7.3, 5mM NaOH, 2,5mM NaHCO₃) und 15ml Percoll™ (Amersham, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden), mit einer Dichte von 1,131 g/ml, aufgenommen, resuspendiert und bei 360g für 10 Minuten zentifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das verbliebene Pellet wurde erneut in 20ml 30% Percoll™ aufgenommen, resuspendiert und mit dem gleichen Volumen 70% Percoll™ unterschichtet. Nun wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt (1230g, 20 Minuten ohne Bremse, RT) und der Interphasering, der die Lymphozyten beinhaltet, abgenommen und anschließend mehrmals in Waschmedium gewaschen [SCHIEFERDECKER et al., 1992, #; ZEITZ et al., 1988, #, MONTELEONE et al., 1997, #]. Die Zellzahl und Vitalität der Lymphozyten wurden in einer Neubauer-Zählkammer mittels Trypanblaufärbung bestimmt.

3.3.2. Separation peripherer mononukleärer Zellen

Humane mononukleäre Zellen wurden aus frischem heparinisiertem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Als Trennmedium diente Ficoll-Paque™ (Amersham, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden).

Hierzu wurden ungefähr 10 bis 20ml Blut mit 10ml PBS (Merck, Darmstadt) in einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen) verdünnt und vorsichtig mit 10ml Ficoll-Paque™ unterschichtet. Die nach der anschließenden Dichtezentrifugation (990g bei RT, 15 Minuten ohne Bremse) zwischen Plasma und Trennmedium entstandene homogene Bande aus mononukleären Zellen, der sogenannte Interphasering, wurde abpipetiert und die Zellen in Waschmedium (RPMI 1640 (Life Technologies, Karlsruhe), 10% Fetales Kälberserum, 0,05 mg/ml Penicillin (Hoechst, Frankfurt a. M.), 0,05mg/ml Streptomycin (Biochrom, Berlin), 0,01M HEPES pH 7.3, 5mM NaOH, 2,5mM NaHCO₃) mehrmals gewaschen. Anschließend erfolgte die Zellzählung mittels einer Neubauer-Zählkammer in 2%iger Essigsäure, um noch eventuell vorhandenen Erythrozyten zu lysieren.

3.4. Zellkulturen

3.4.1. Allgemeine Kulturbedingungen

Sämtliche Zellkulturen wurden in einem Inkubator in wasserdampfgesättigter Atmosphäre unter 5%iger CO₂-Begasung bei 37°C durchgeführt. Der Austausch des Nährmediums erfolgte in Abhängigkeit vom Wachstumsverhalten der jeweiligen Zellen. Je nach Bedarf und Zellzahl erfolgte die Kultivierung in 50ml- oder 250ml-Kulturflaschen oder 24- bzw. 96-Well-Zellkulturplatten (Greiner, Frickenhausen).

3.4.2. Kulturmedien

3.4.2.1. Kulturmedium für Lymphozyten

RPMI 1640 (Life Technologies, Karlsruhe), 10% Fetales Kälberserum, 4mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin), 0,05 mg/ml Penicillin (Hoechst, Frankfurt a. M.), 0,05 mg/ml Streptomycin (Biochrom, Berlin)

3.4.2.2. Kulturmedium für Fibroblasten

DMEM (Dulbeccos`s MOD Eagle Medium; Life Technologies, Karlsruhe), 10% Fetales Kälberserum, 4mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin), 0,05 mg/ml Penicillin (Hoechst, Frankfurt a. M.), 0,05 mg/ml Streptomycin (Biochrom, Berlin)

3.4.3. Kultivierung und Stimulation von Zellen

3.4.3.1. Kultivierung von Lymphozyten

Die frisch isolierten Lymphozyten aus der Lamina propria oder aus peripherem Blut wurden, je nach Versuchsansatz und Zellzahl, in Kulturflaschen oder auf Zellkulturplatten (Greiner, Frickenhausen) gehalten. Dazu wurde das in 3.4.2.1. beschriebene Medium verwendet.

3.4.3.2. In-vitro-Stimulation von Lymphozyten durch mitogene Substanzen

Bei der mitogenen Stimulation von Lymphozyten aus der Lamina propria oder aus peripherem Blut wurde Phytohämagglutinin (PHA), ein Lectin aus der Roten Kidneybohne *phaseolus vulgaris*, eingesetzt. Darunter werden verschiedene Glykoproteine zusammengefasst, die eine Quervernetzung des T-Zell-Rezeptors initiieren und somit einen mitogenen Reiz auf den Lymphozyten auslösen.

Hierzu wurden frisch isolierte mononukleäre Zellen mit einer Dichte von 10^5 bis 10^6 Zellen/ml Kulturmedium (siehe 3.4.2.1.) ausgesät und je nach Versuchsansatz, über 6, 12 und 24 Stunden mit Phytohämagglutinin (2 μ g/ml) (Sigma, Deisenhofen) inkubiert. Nach dieser Stimulation wurden die Zellen erneut in Suspension gebracht und abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in Waschmedium aufgenommen und einmal gewaschen. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellen im entsprechenden Medium aufgenommen.

3.4.3.3. In-vitro-Stimulation von peripheren Lymphozyten durch rekombinantes humanes Interleukin-12

Um zu untersuchen, ob IL-12 die IL-12R- β 2-Expression erhöhen kann, wurden frisch isolierte periphere mononukleäre Zellen mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml Kulturmedium (siehe 3.4.2.1.) ausgesät und je nach Versuchsansatz über 24 bzw. 72 Stunden mit rhIL-12 (4 μ g/ml) (Sigma, Deisenhofen) und PHA (2 μ g/ml) (Sigma, Deisenhofen) inkubiert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen in Waschmedium aufgenommen, einmal gewaschen und zur weiteren Verarbeitung im entsprechenden Medium zur RNA-Extraktion bzw. FACS-Analyse suspendiert.

3.4.3.4. Kultivierung von Fibroblasten

Die Kultivierung von adhärent wachsenden Fibroblasten erfolgte als Monolayerkultur in einem Kulturmedium für Fibroblasten (DMEM (Life Technologies, Karlsruhe), 10% Fetales Kälberserum, 4mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin), 0,05 mg/ml Penicillin (Hoechst, Frankfurt a. M.), 0,05 mg/ml Streptomycin (Biochrom, Berlin) und in Abhängigkeit der Zellkulturgröße in Zellkulturflaschen oder auf Flachbodenzellkulturplatten.

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen nach 2 bis 4 Tagen passagiert. Die Zellen wurden hierzu mit Trypsin/EDTA (PAA laboratories, Linz, Österreich) inkubiert; wobei Trypsin die Interzellularbrücken und die Verbindungen zum Boden des Kulturgefäßes auflöst und EDTA als Komplexbildner, die für die Proteinwechselwirkung notwendigen Calciumionen bereitstellt. Nach Auflösen des Zellrasens wurde die Suspension zentrifugiert und die Zellen mehrmals gewaschen. Anschließend wurden die Fibroblasten im Verhältnis 1:10 aufgesplittet und mit frischem Kulturmedium in neue Kulturbedältnisse umgebettet.

3.4.3.5. Kokultivierung von Lymphozyten und Fibroblasten

In dieser Kokultur wurden die Effekte auf Lymphozyten der Lamina propria (=LPL) durch das kostimulatorische Molekül B7.1 (CD80) und Anti-CD3-Antikörper untersucht.

Es wurde hierzu eine B7.1-positive oder B7.1-negative, stabil transfizierte Maus Ltk⁻-Zell-Linie (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von T. Giese, Immunologisches Institut, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg) eingesetzt, die CDw32 und die FcγRII-Domäne des CDw32 exprimieren [DEFRANCE et al., 1992]. Bei dieser Stimulation bindet der Fc-Teil von CDw32 an den Fc-Teil des Anti-CD3-Antikörpers, wobei dieser nun den T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex aktiviert. Durch die Bindung des akzessorischen Moleküls B7.1 (CD80) an seinen Liganden CD28 an der Oberfläche der T-Zelle wird ein kostimulatorisches Signal für die T-Zell-Aktivierung ausgelöst (siehe Abb. 1) [EBERT et al., 1996; GREENFIELD et al., 1998].

Pro Versuchsansatz wurden $2,5 \times 10^5$ Ltk⁻-Zellen in eine 24-Well-Flachbodenzellkultur-Platte ausgesät und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 1×10^6 Lymphozyten hinzugegeben. Durch Crosslinking wurden die mononukleären Zellen in den entsprechenden Wells mit 2 µg/ml monoklonalen Anti-CD3-Antikörper (OKT3; American Type Culture Collection, Rockville, MD) für 6 bzw. 22 Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Zellen im entsprechenden Medium zur weiteren Analyse aufgenommen.

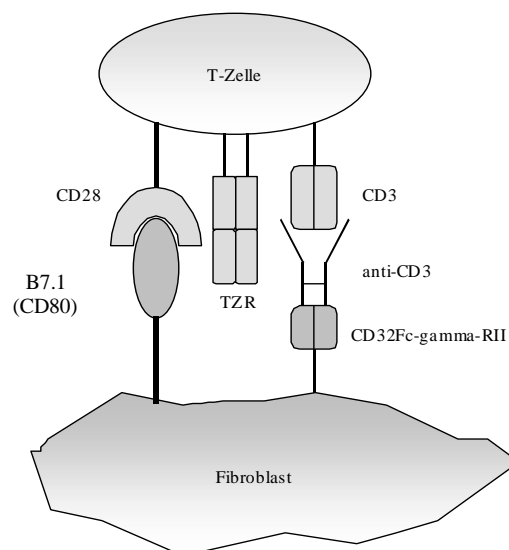


Abb. 2 : Schematische Zeichnung der Kostimulation von Lymphozyten durch B7.1 (CD80) und Anti-CD3-Antikörper

3.5. Molekularbiologische Analysen

3.5.1. RNA – Isolierung

Zur Isolierung von RNA (Ribonukleinsäure) aus Lymphozyten wurde der RNeasy Mini-Kit (50) (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nach Angaben des Herstellers wie folgt durchgeführt:

Zuerst wurden die aus der Lamina propria und dem peripheren Blut gewonnenen Lymphozyten (max. 5×10^6 Zellen pro Ansatz) zur Zelllyse in 350µl RLT-Puffer aufgenommen, der Guanidin-Isozyanat zur Inaktivierung von RNase enthält. Das Lysat wurde durch Vortexen homogenisiert, um einerseits die enthaltene genomische DNA zu scheren und andererseits die Viskosität zu reduzieren. Um die Bindung der RNA an die Membran der im Kit enthaltenen RNA-Isolationssäulen zu ermöglichen, wurde das Homogenisat mit 350µl 70% Ethanol gemischt und in das Säulensystem überführt. Die membrangebundene RNA wurde durch Zentrifugation für 15 Sekunden bei $\geq 8000 \times g$ separiert und dreimal gewaschen (1 x 700µl RW1-Puffer; 2 x 500µl RPE-Puffer). Die Elution erfolgte nach Zugabe von 2 x 25µl RNase-freiem Wasser mittels Zentrifugation (60 Sekunden bei $\geq 8000 \times g$). Anschließend wurde der RNA-Gehalt photometrisch bestimmt.

3.5.2. Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mittels eines Spektrometers. Die maximale Lichtabsorption von Nukleinsäuren findet sich bei einer Wellenlänge von 260 nm (UV-Licht). Durch die Messung des absorbierten Lichtes dieser Wellenlänge, lässt sich die Konzentration der gelösten RNA bestimmen. Die RNA-haltige Lösung wurde hierzu in DEPC-Wasser 1: 50 verdünnt. Zur Angabe des RNA-Gehaltes der ursprünglichen Lösung in ng/ml, wurde die in einer Quarzküvette gemessene Extinktion mit dem Faktor 40 x Verdünnungspuffer multipliziert.

3.5.3. DNase – Verdau

Um noch eventuell vorhandene DNA zu inaktivieren, wurde vor der cDNA-Generierung ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurde 1µg RNA (absolut) eingesetzt. Zu dieser wurde 1µl 10 x DNase I Reaktionspuffer (Life Technologies, Karlsruhe), 1µl (1U/ml) DNase I Amp Grade (Life Technologies, Karlsruhe) hinzugefügt und mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 10µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Um die DNase I wieder zu inaktivieren, wurde 1µl 25mM EDTA (Life Technologies, Karlsruhe) hinzugegeben und für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Hierbei ist anzumerken, dass es sehr wichtig ist, die Inkubationszeiten und -Temperaturen einzuhalten; denn längere Inkubationszeiten und höhere Temperaturen können eine Magnesium-abhängige Hydrolyse der RNA einleiten. Anschließend erfolgte eine erneute Konzentrationsbestimmung der RNA mit Hilfe eines Spektrometers (siehe 3.5.2.).

3.5.4. Oligonukleotide

Die Herstellung der Primer wurde bei der Firma TIB MOLBIOL Syntheselabor (Berlin) in Auftrag gegeben.

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurden Oligonukleotide mit den folgenden Sequenzen verwendet:

Nachweis von β-Actin:

5` - GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT - 3`

5` - GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT AGG C - 3`

Nachweis des IL-12 Rezeptors β1:

5` - GAT CTC AAA GAC AAC CAA CTA GTG - 3`

5` - CTC CAG CTG GAA GAC TCC TCC CAG - 3`

Nachweis des IL-12 Rezeptors β2:

5` - GGA AGA TTG TCA AGA AGA GAC GG - 3`

5` - TGA GAT TTT TAG AGT AAC AGG - 3`

3.5.5. cDNA – Generierung

Nachdem die Gesamt-RNA aus Lymphozyten extrahiert und ein DNase-Verdau durchgeführt wurde, erfolgte die Umschreibung in c-DNA (=komplementäre DNA) mittels reverser Transkriptase. Hierzu wurde 1µg RNA mit 1µl (0,5µg/µl) Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Life Technologies, Karlsruhe) versetzt, auf ein Volumen von insgesamt 10µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt und für 10 Minuten bei 70°C erhitzt und anschließend für eine Minute auf Eis gelagert. Danach wurden 4µl 1st Strand-Buffer (5fach Reaktionpuffer; Life Technologies, Karlsruhe), 2µl DTT (=Dithiotreitol; Life Technologies, Karlsruhe), 1µl 10mM dNTP (= Nukleotidtriphosphate; Sigma, Deisenhofen) hinzugefügt und bei 42°C für 5 Minuten im Wasserbad inkubiert. Die c-DNA-Synthese wurde nun durch die Zugabe von 1µl (200U/µl) Moloney murine leukemia virus Reverse Transkriptase (M-MLV-RT; Life Technologies, Karlsruhe) gestartet und erfolgte für 50 Minuten bei 42°C und für weitere 15 Minuten bei 70°C.

3.5.6. Konzentrationsbestimmung der c-DNA

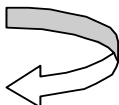
Die Konzentrationsbestimmung der c-DNA erfolgte mittels eines Spektrometers (siehe 3.5.2.). Die gemessene Extinktion wurde hierbei jedoch mit dem Faktor 50 x Verdünnungsfaktor multipliziert, um eine Aussage über die in der Lösung enthaltene c-DNA-Menge in ng/ml, treffen zu können.

3.5.7. Amplifikation spezifischer Produkte durch eine Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Sequenzen erfolgte mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Diese Standardmethode ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung einzelsträngiger DNA, wobei lediglich eine Kopie des Templates vorliegen muss. Um RNA durch eine PCR zu vervielfältigen, wird ein Primer an die RNA-Matrize hybridisiert und mittels der reversen Transkriptase (RT) eine einzelsträngige c-DNA-Kopie erstellt (siehe 3.5.5.). Diese Methode erlaubt eine Semi-Quantifizierung von mRNA (messenger-RNA) [WANG et al., 1989 #; STALLMACH et al., 1999 #].

Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion beruht auf einem dreiteiligen Reaktionszyklus. Im ersten Schritt wird die Template-DNA bei einer Temperatur von 95°C denaturiert, d.h. die Tertiärstruktur wird aufgelöst. Dies ist notwendig, um im nachfolgenden Schritt eine Anlagerung der Oligonukleotide (siehe 3.5.4.) an den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt zu ermöglichen. Um das Anbinden der Primer zu ermöglichen, wird der Reaktionsansatz auf die sogenannte Annealing-Temperatur, welche je nach Art des Primers variiert, abgekühlt. Zuletzt erfolgt die vom Oligonukleotid ausgehende Doppelstrangsynthese bei einer Temperatur von 72°C. Diese Reaktionsschleife kann beliebig oft durchlaufen werden.

Alle verwendeten Reagenzien, außer dem Template, wurden mit einem, ausschließlich für die PCR vorbehaltenen Pipettensatz zusammengegeben, so dass eine Kontamination so gering als möglich gehalten wurde. Dabei wurden 1µl c-DNA (1µg/µl), 5µl 10fach-magnesium-freier-PCR-Reaktionspuffer (Life Technologies, Karlsruhe), 1,5µl 50mM MgCl₂ (Life Technologies, Karlsruhe), 1,5µl 10mM dNTP (Sigma, Deisenhofen) und jeweils 0,5µl des Upstream- und Downstream-Primers (50µM) zusammengegeben und mit Aqua dest. auf ein Volumen von 50µl aufgefüllt. Zuletzt wurden 0,5µl (5U/µl) Taq DNA-Polymerase (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) hinzugefügt und die PCR in einem PCR-Gerät (Thermocycler UNO II, Biometra, Göttingen) unter folgenden Bedingungen durchgeführt

95° C	4 Min.	
95°C	1 Min.	 = 1 Schleife
Annealing	1 Min.	
72° C	2 Min.	
72°C	10 Min.	

Die Schleifenzahl und die exakte Annealing-Temperatur sind, je nach Art des verwendeten Oligonukleotides, variabel:

β-Actin:	56°C Annealing-Temperatur; 26 Zyklen
IL-12-Rezeptor β1:	60°C Annealing-Temperatur; 32 Zyklen
IL-12-Rezeptor β2:	56°C Annealing-Temperatur; 35 Zyklen

3.5.8. Agarose – Gel – Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese dient der Auftrennung und somit der Identifikation der mittels Polymerase-Ketten-Reaktion gewonnenen DNA-Fragmente. Das Prinzip basiert auf der Trennung verschieden großer, negativ geladener Amplifikationsprodukte in einem Spannungsfeld.

Zur Auftrennung wurde die DNA-haltige PCR-Lösung mit einem Probenpuffer markiert. Es wurden 20µl der PCR-Lösung abgenommen und mit 3,5µl einer Bromphenolblau-Lösung (400µl Succrose 50% (Merck, Darmstadt), 63µl Bromphenolblau 0,8% (Sigma, Deisenhofen), 537µl Aqua dest.) versetzt. Die Agarose-Konzentration des Gels betrug 2%. Hierzu wurden 7g Agarose (Peqlab, Erlangen) in 350ml 1 x TBE-Puffer (10,9mg Borsäure Merck, Darmstadt), 5,4mg Tris-Puffer (Merck, Darmstadt), 4 ml 0,5mM EDTA ad 1000ml Aqua dest.) durch Kochen aufgelöst. Nach Abkühlen auf etwa 60°C wurden 10µl (10mg/ml) Ethidiumbromid (Sigma, Deisenhofen) hinzugegeben. Die Lösung wurde nun in einen mit einem Kamm ausgestatteten Gelträger gegossen. Nach Polymerisation der Polysaccharid-Lösung wurde der Kamm entfernt und das ausgehärtete Gel in eine Gelkammer (Horizon™ 20•25, Life Technologies, Karlsruhe) mit 1 x TBE-Puffer (Laufpuffer) gebracht. Anschließend wurde die markierte DNA-Lösung in die ausgesparten Slots pipettiert. In eine der Taschen wurden DNA-Fragmente von bekannter Größe als Längenmarker gegeben (100bp-DNA-Ladder (1µg/µl); Life Technologies, Karlsruhe). Nach Anlegen eines Spannungsgradienten von etwa 110mV, wurde die Elektrophorese für 2,5 Stunden durchgeführt. Nach entsprechender Laufstrecke in Richtung der Anode wurde das Gel aus dem Schlitten entnommen und unter UV-Beleuchtung mit Hilfe eines Sofortbildkamera-Systems (Biometra, Göttingen) photographiert.

3.5.9. Densitometrische Auswertung

Zur Dichtemessung der Banden wurde die aus dem Gel hergestellte Photographie mit Hilfe eines Gel-Scanners eingescannt (FLA-2000 Scan) und mit der entsprechenden Software (Image Gauge 3.0 program, Fuji, Japan) die Dichte der Banden ermittelt.

Dazu wurden die Log2-Werte der optischen Einheiten (LAU = light arbitrary units) gegen die Anzahl der Zyklen aufgezeichnet (Abb. 3). Ein repräsentatives Gel ist in Abbildung 4 dargestellt. Zwischen den Amplifikationsraten und den definierten Zyklen besteht eine lineare Beziehung. Die ermittelten Werte steigen ab einer Zyklenanzahl von $n=36$ nicht mehr weiter an und erreichen schließlich ein Plateau.

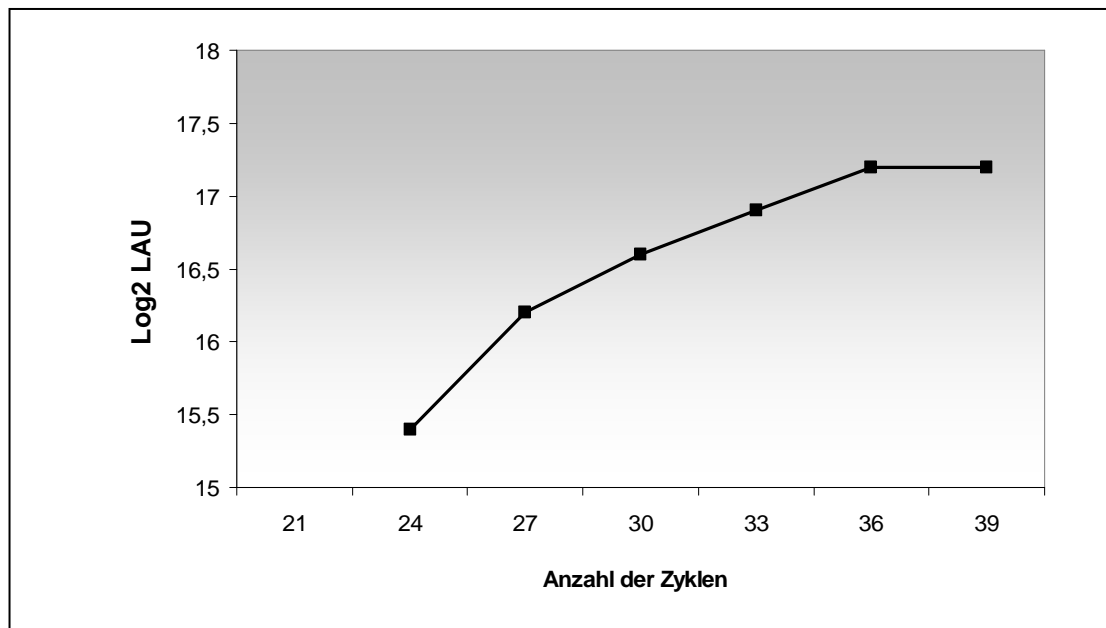


Abb. 3: Densitometrische Semiquantifizierung der RT-PCR-Produkte. Es zeigt sich eine lineare Korrelation zwischen der Anzahl der Zyklen und den Log2-Werten der optischen Einheiten.

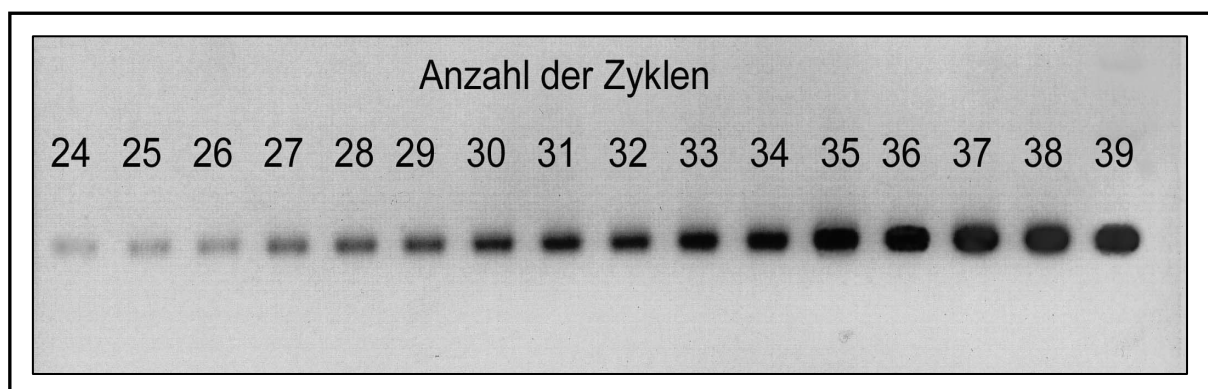


Abb. 4: Agarose-Gel: Mit zunehmender Zyklenanzahl zeigt sich eine Steigerung der RT-PCR-Produkte, bis nach 36 Zyklen ein Plateau erreicht wird.

3.6. Immunzytochemische Tests

3.6.1. Durchflusszytometrie

Bei der Analyse und Auswertung der in der Durchflusszytometrie gewonnenen Daten, wurden die Geräte FACS-Vantage und FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) und die entsprechende Software des Herstellers verwendet (Cell Quest™).

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine fluoreszenzabhängige, multiparametrische Analyse von vitalen Zellen in Suspension. In einem optischen System werden Streulicht- und Fluoreszenzsignale von Partikeln analysiert. Es besteht die Möglichkeit gleichzeitig bis zu fünf verschiedene physikalische und biochemische Parameter einer einzelnen Zelle zu bestimmen. Die Streulichtsignale geben Auskunft über die Größe und Granularität, der im Flüssigkeits-Strom fokussierten Zellen. Darüber hinaus können die Zellen durch bis zu drei verschiedene Fluoreszenzmessungen charakterisiert werden. Entsprechend der angewandten Färbemethode kann die Fluoreszenzmarkierung auf der Zelloberfläche, im Zytosol oder innerhalb des Zellkernes erfolgen.

Die zur Zellmarkierung verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich durch einen speziell ausgerichteten Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm anregen. Die spezifischen Emissionssignale werden mittels Photodetektoren und ihnen vorgeschalteten Filtern gemessen; wobei die Filtersysteme nur den für jeden Farbstoff charakteristischen Anteil des Emissionsspektrums passieren lassen. Der charakteristische Bereich für Fluorescein (Fluorescein-Isothiozyanat = FITC) liegt bei 530 nm, für Phycoerythrin (PE) bei 585 nm und für Rhodamin-Phycoerythrin-Cy5 bei 682 nm. Die optischen Signale werden in elektrische Impulse konvertiert, wobei die Höhe der elektrischen Signale der Intensität der detektierten Lichtsignale entspricht. Ein Analog/Digitalwandler konvertiert die in Volt gemessenen Signalintensitäten in digitale Daten, die mit der entsprechenden Software, Cell Quest™ (Becton & Dickinson, Heidelberg), erfasst und ausgewertet wurden.

3.6.1.1. Färbung von Molekülen der Zelloberfläche

Die Fluoreszenzmarkierung von Zelloberflächenantigenen erfolgte als indirekter Immunfluoreszenztest.

Zur Vermeidung einer Internalisierung der gebundenen Antikörper bei der Markierung von Zellmembranantigenen, erfolgten die Immunfluoreszenztests bei 4°C. Die zu testenden Zellen, frisch isolierte, sowie kultivierte Lymphozyten, wurden zunächst in 4°C kaltes PBS/5%FCS aufgenommen und auf eine Konzentration von 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und je 100µl dieser Zellsuspension in ein Teströhrchen pipettiert. Es erfolgte eine fünfminütige Inkubation in PBS/5%FCS bei 4°C, um eine unspezifische Bindung der fluoreszenzmarkierten Antikörper an Antigene der Zelloberfläche zu verhindern. FCS bindet hierbei an die Fc-Rezeptoren der Zellmembranantigene, so dass eine spezifische Bindung der Antikörper nur noch an den variablen Regionen der Antigene stattfinden kann.

Anschließend wurde die entsprechende primäre Antikörperlösung in austitrierter Konzentration hinzugegeben (Anti-human CD4-PE, 10µg/ml; Anti-human CD3-Rhodamin-Phycoerythrin-Cy5, 10µg/ml; Ratte-anti-human IL-12Rβ1- und Ratte-anti-human IL-12Rβ2-Antikörper, 10µg/ml). Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 4°C und zweimaligem Waschen in PBS/5%FCS erfolgte die Zugabe von 10µg/ml sekundärem, fluoresceinmarkiertem Antikörper. Es wurden Ziege-anti-Ratte-FITC-Antikörperkonjugate verwendet. Nach Zugabe des sekundären Antikörpers wurde für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal in PBS/5%FCS gewaschen und für die FACS-Analyse in 500µl PBS/5%FCS aufgenommen. Konnten die Proben nicht innerhalb 24h gemessen werden, wurden diese mit PBS/2%Formaldehyd fixiert und bis zur Analyse lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

3.6.1.2. Antikörper

Klon	Isotyp	Konjugat	Spezifität	Hersteller
UCHT1	Maus IgG2a _κ	Rhodamin-Phycoerythrin-Cy5	CD3; humane T-Lymphozyten	DAKO, Hamburg
MT310	Maus IgG2a _κ	Phycoerythrin (PE)	CD4; humane T-Lymphozyten	DAKO, Hamburg
10D10	Ratte IgG2a _κ	---	IL-12Rβ2	*1
2B10	Ratte IgG2a _κ	---	IL-12Rβ1	DAKO, Hamburg
	Ziege	Fluorescein-Isocyanat (FITC)	IgG; Ratte	DAKO, Hamburg

***1** freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. D. Presky, Hoffmann-La Roche, Nutley, N.J., USA

3.6.1.3. Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen

Zuerst wurden die, auf verschiedene Oberflächenmoleküle hin gefärbten Zellen, hinsichtlich ihrer Größe und Granularität im charakterisiert. Dabei erfolgte die Abgrenzung von Lymphozyten zu noch eventuell vorhandenen Monozyten und avitalen Zellen durch Definition eines digitalen Gates. Bei der anschließenden Auswertung der Fluoreszenzen wurden nur noch die Lymphozyten betrachtet. Die Abgrenzung von CD3/CD4-positiven Lymphozyten erfolgte durch das Definieren eines zweiten digitalen Gates. Durch die Kombination beider Auswahlkriterien können diese T-Zellen von der Gesamtpopulation ausgegrenzt und hinsichtlich entsprechender Fluoreszenzen ausgewertet werden. Die Darstellung der Messungen erfolgte, je nach Intensität der Fluoreszenzsignale, in Form von Punktwolken (Dot-Plots) oder Histogrammen. Mittels Quadrantenstatistik oder einer Histogramm-Subtraktionsanalyse erfolgte die Quantifizierung einer bestimmten Fluoreszenz.

3.7. Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Wilcoxon Rank Test durchgeführt; p-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

3.8. Laborbedingungen

Die Experimente dieser Arbeit wurden in einem immunologisch-molekularbiologischen Labor der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. Die verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad „pro analysi“.

3.9. Computersoftware

Diese Arbeit wurde mit dem Textverarbeitungsprogramm Microsoft Word 2000 erstellt. Die graphischen Darstellungen wurden mit den Programmen Microsoft Draw 98 Drawing, Excel 2000 und Power Point 2000 erstellt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Expression der IL-12R- β 1- und IL-12R- β 2-Transkripte in nicht-entzündetem Darmgewebe der Kontrollgruppe

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Expression der IL-12R- β 1- und IL-12R- β 2-mRNA an mononukleären Zellen der Lamina propria untersucht, die aus nicht-entzündeten Kolon-Arealen isoliert wurden. Hierzu wurde Gewebe von den ersten 7 Patienten mit einem kolorektalen Karzinom, die als Kontrollgruppe dienten, entnommen und die Expression der IL-12R-Untereinheiten an Lamina propria Lymphozyten mittels RT-PCR untersucht. In Abbildung 5 sind die RT-PCR-Transkripte für β -Aktin, IL-12R- β 1 und IL-12R- β 2 eines Patienten exemplarisch dargestellt.

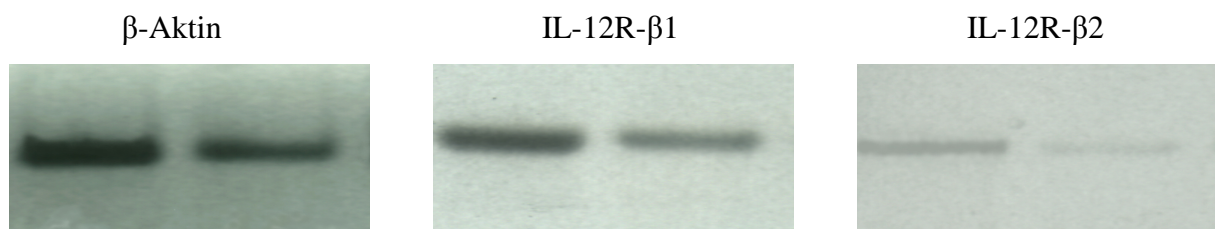


Abb. 5: RT-PCR-Transkripte mononukleärer Zellen eines Patienten mit kolorektalem Karzinom aus Regionen nicht-entzündeter Mukosa). [β -Aktin - 26 Zyklen, 300bp; IL-12R- β 1 - 32 Zyklen, 531bp; IL-12R- β 2 - 32 Zyklen, 472bp; Lane 1 jeweils 10 μ l cDNA, Lane 2 jeweils 2,5 μ l cDNA]

Wenn man das Fluoreszenz-Verhältnis von IL-12R- β 1 zu β -Aktin betrachtet, welches das Expressionsniveau der IL-12R- β 1-mRNA repräsentiert, kann ein Median von 20% ermittelt werden (Minimum: 12,2%; Maximum 28%). Das Fluoreszenz-Verhältnis von IL12R- β 2 zu β -Aktin ergibt einen Median von 17,9% (Minimum: 7,4%; Maximum: 35,8%). Zusammenfassend müssen diese Ergebnisse, bei $p=0,46$, als nicht signifikant gewertet werden. Somit ist davon auszugehen, dass sich in nicht-entzündetem Gewebe kein Unterschied in der Expression beider IL-12-Rezeptoruntereinheiten findet (Abb.6).

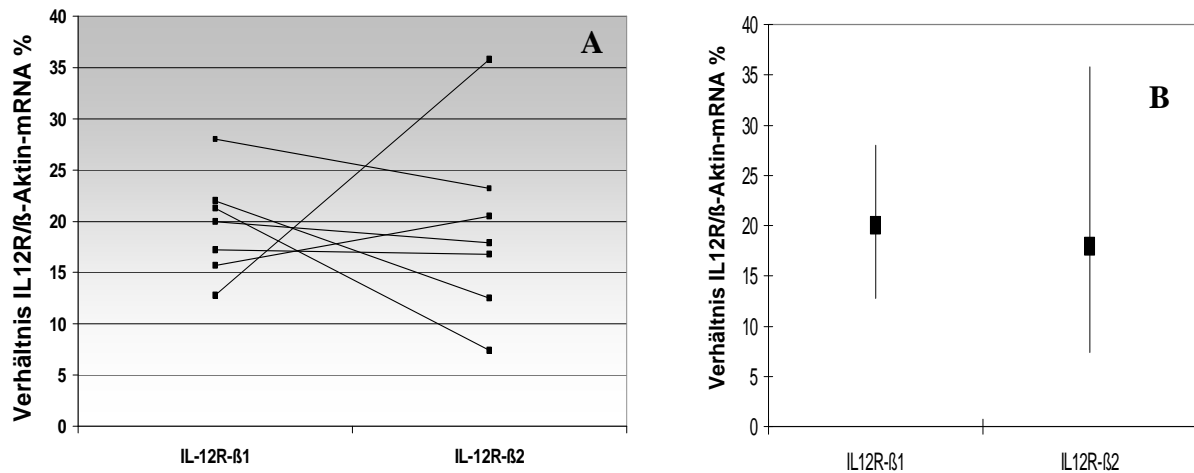


Abb. 6: A) Verhältnis für IL-12R-β1/β-Aktin-mRNA nicht-entzündeter Mukosa von Patienten der Kontrollgruppe; B) Darstellung der entsprechenden Median-Werte aller Patienten (n=7): IL-12Rβ1/β-Aktin-mRNA = 20% (Min.:12,2%, Max.:28,0%) und IL-12R-β2/β-Aktin; Median= 17,9% (Min.: 7,4%, Max.: 35,8%); $p = 0,46$.]

4.2. Expression des IL-12Rβ1 und IL-12Rβ2 bei chronisch entzündlichen Darm-erkrankungen

4.2.1. Expression der IL-12Rβ1- und IL-12Rβ2-Transkripte in entzündeter Mukosa bei Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa

Um die Expression der IL-12R-Untereinheiten-Transkripte bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu charakterisieren, wurden LPMNC von 12 Patienten mit M. Crohn und 9 Patienten mit Colitis ulcerosa aus entzündeten Regionen des Kolons isoliert. Anschließend wurden die Transkripte für β-Aktin, IL-12R-β1 und IL-12R-β2 mittels semiquantitativer RT-PCR ermittelt.

IL-12R-β1- und IL-12R-β2-Transkripte konnten in allen Lamina propria Lymphozyten bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung nachgewiesen werden. In Abbildung 7 und 8 ist je ein repräsentatives Ergebnis eines M. Crohn- bzw. eines Colitis-Patienten aufgezeigt.

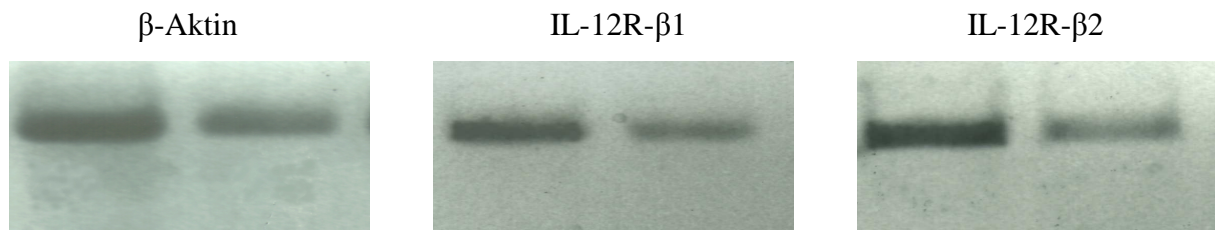


Abb. 7: RT-PCR-Transkripte mononukleärer Zellen eines Patienten mit aktiven *M. Crohn* aus Regionen entzündeter Mukosa. [β -Aktin - 26 Zyklen, 300bp; IL-12R- β 1 - 32 Zyklen, 531bp; IL-12R- β 2 - 32 Zyklen, 472bp; Lane 1 jeweils 10 μ l cDNA, Lane 2 jeweils 2,5 μ l cDNA]

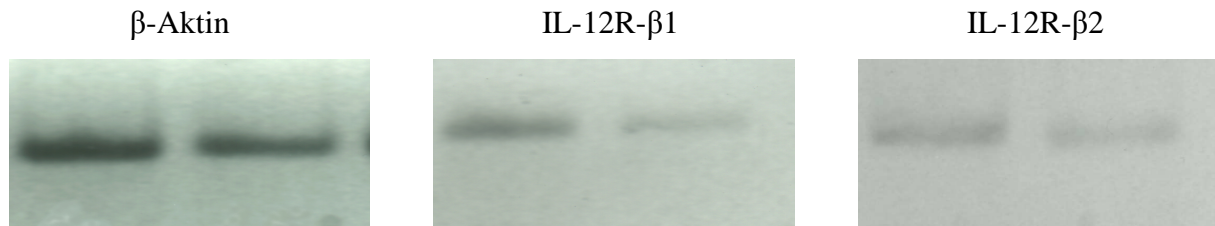


Abb. 8: RT-PCR-Transkripte mononukleärer Zellen eines Patienten mit aktiver *Colitis ulcerosa* aus Regionen entzündeter Mukosa. [β -Aktin - 26 Zyklen, 300bp; IL-12R- β 1 - 32 Zyklen, 531bp; IL-12R- β 2 - 32 Zyklen, 472bp Lane 1 jeweils 10 μ l cDNA, Lane 2 jeweils 2,5 μ l cDNA]

In Abbildung 9 und 10 ist das Expressionsniveau beider Rezeptoruntereinheiten auf mRNA-Ebene in entzündeter Mukosa aller untersuchten Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen dargestellt. Durch densitometrische Auswertung der amplifizierten Transkripte für beide Rezeptoruntereinheiten, konnte in entzündlich veränderter Mukosa von Patienten mit *M. Crohn*, im Vergleich zu entzündeter Mukosa bei Patienten mit *Colitis ulcerosa* eine gesteigerte Transkript-Konzentration des IL-12R- β 1 und des IL-12R- β 2 festgestellt werden.

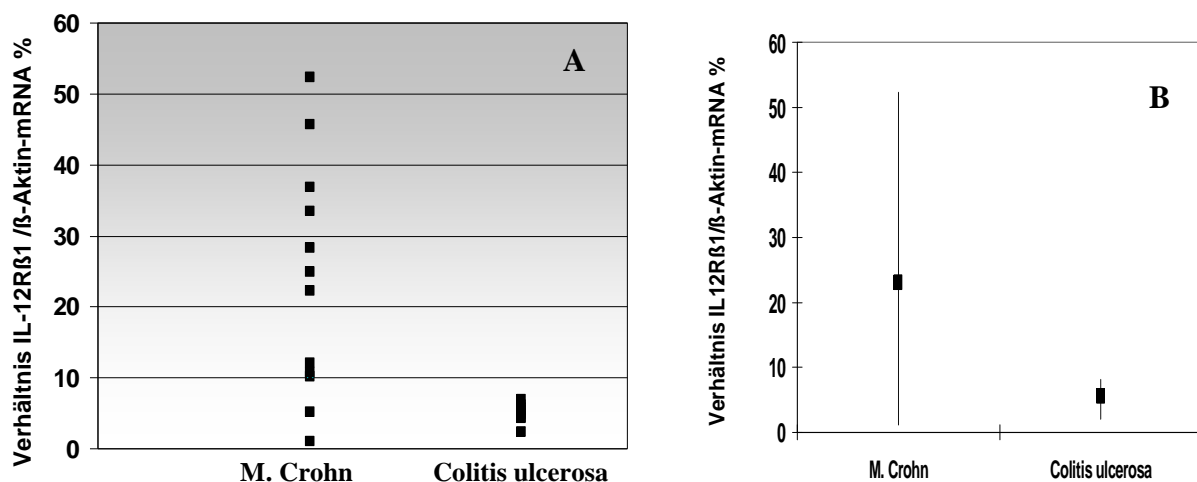


Abb. 9: A) Verhältnis IL-12R β 1-mRNA/ β Aktin-mRNA bei Patienten mit *M. Crohn* (n=12) und *Colitis ulcerosa* (n=9) in %. B) Darstellung der zugehörigen Median-Werte aller Patienten mit *M. Crohn* (=23,8%; Min.: 1,7%, Max.: 52,3%) und *Colitis ulcerosa* (=7,3%; Min.: 2,7%, Max.: 7,2%)

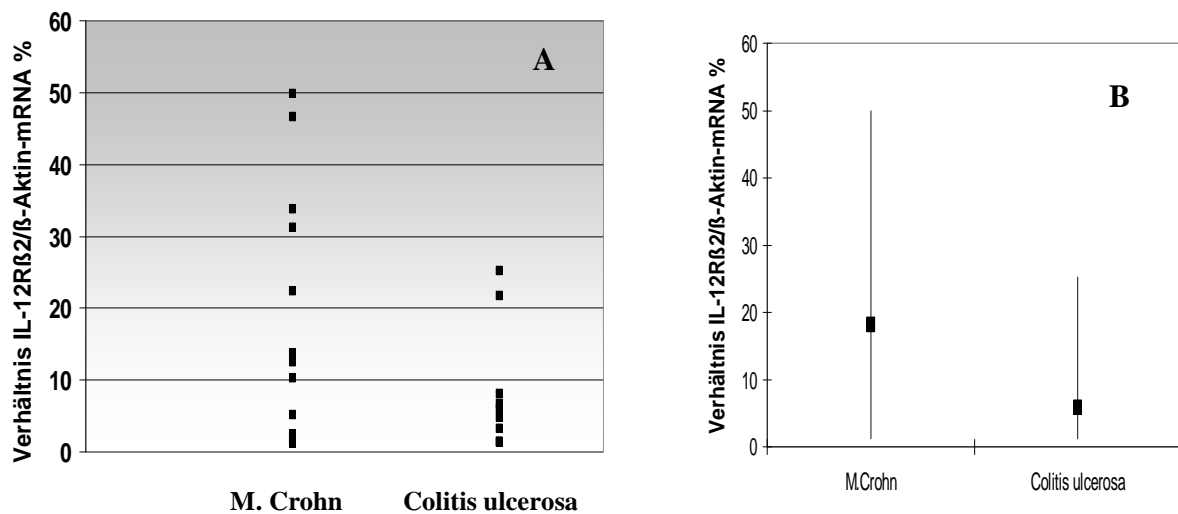


Abb. 10: **A)** Verhältnis IL-12Rβ2-mRNA/β-Aktin-mRNA bei Patienten mit M. Crohn (n=12) und Colitis ulcerosa (n=9) in %. **B)** Darstellung der zugehörigen Median-Werte aller Patienten mit M. Crohn (=18%; Min.:1,2%, Max.:49,9%) und Colitis ulcerosa (=5,9%; Min.: 1,3%, Max.:25,9%).

4.2.2. Expression des IL-12R-β2 auf Proteinebene bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Da sich bereits nach Untersuchung der ersten Patienten, eine erhöhte Expression beider IL-12-Rezeptoruntereinheiten auf mRNA-Ebene in entzündetem Gewebe von M. Crohn-Patienten vermuten ließ, wurde im weiteren Verlauf der Versuchsreihe, neben der Semiquantifizierung von RT-PCR-Transkripten, die Expression des IL-12Rβ2 näher charakterisiert.

Dazu wurde eine durchflusszytometrische Analyse der IL-12Rβ2-Expression auf Lamina propria Lymphozyten bei jeweils 5 Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa durchgeführt und mit 7 Patienten der Kontrollgruppe verglichen. Die isolierten LPMNC wurden durch eine Dreifach-Fluoreszenzfärbung hinsichtlich ihrer Oberflächenantigene charakterisiert. Alle Zellen wurden mit anti-CD3, anti-CD4- und anti-IL-12Rβ2-Ak markiert. Durch Definition eines digitalen Gates, wurde die Expression des IL-12Rβ2 selektiv auf CD3/CD4-positiven T-Helferzellen ausgewertet.

In Abbildung 11 ist der Anteil IL-12R β 2-positiver CD4-Lymphozyten der Lamina propria der untersuchten Patienten dargestellt. Bei 5 Patienten der Kontrollgruppe war dieser Anteil unter 15% (Median: 10,3%), wobei 2 Patienten einen Anteil von 32% bzw. 43% zeigten. Bei Patienten mit einer aktiven Colitis ulcerosa konnte, im Vergleich zur Kontrollgruppe, ein ähnliches Expressionsniveau beobachtet werden (Median: 8,8%). Im Gegensatz dazu, war der Prozentanteil IL-12R- β 2-positiver Zellen bei Patienten mit einem aktiven M. Crohn signifikant erhöht (Median: 42%).

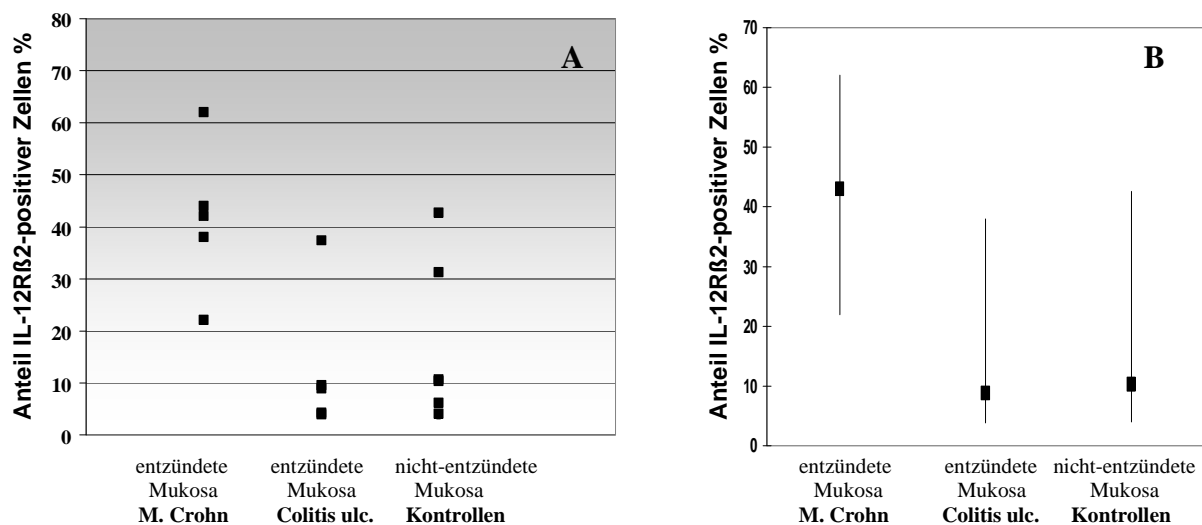


Abb. 11: FACS-Analyse: **A)** Expression der IL-12R- β 2-Untereinheit auf CD3/CD4 $^{+}$ -Lymphozyten der Lamina propria von Patienten mit einer aktiven chronisch entzündlichen Darmerkrankung und Kontrollen.. **B)** Darstellung der Median-Werte der untersuchten Patienten: M. Crohn (n=5) entzündet: 42%; Colitis ulcerosa (n=5) entzündet: 8,8%; normale Mukosa/Kontrollen (n=7): 10,3%.

4.2.3. Expression der IL-12R-Untereinheiten in entzündeten und nicht entzündeten Darmabschnitten bei Patienten mit M. Crohn

4.2.3.1. Expression der IL-12R- β 1- und IL-12R- β 2-Transkripte in entzündlich und nicht-entzündlich veränderten Darmabschnitten bei Patienten mit M. Crohn

Bei der Untersuchung entzündeter Mukosa von Patienten mit M. Crohn konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu Patienten mit Colitis ulcerosa eine erhöhtes Expressionsniveau beider Rezeptorketten auf mRNA- und Proteinebene beobachtet werden. Dieses Ergebnis impliziert die Frage, ob sich dieser Unterschied auch intra-individuell in entzündeter und nicht-entzündeter Mukosa von M. Crohn-Patienten zeigen lässt.

Dazu wurde die Amplifikation von Transkripten der IL-12R-Untereinheiten mononukleärer Zellen aus paarigen Regionen, die makroskopisch a) nicht-entzündlich verändert und b) entzündlich verändert waren, von M. Crohn-Patienten (n=5) miteinander verglichen.

IL-12R-Transkripte konnten sowohl in entzündeter, als auch in nicht-entzündeter Mukosa für beide Rezeptoruntereinheiten amplifiziert werden. In Abbildung 12 sind exemplarisch die RT-PCR-Transkripte für β -Aktin, den IL-12R β 1 und β 2 in entzündeter und nicht-entzündeter Mukosa eines Patienten mit M. Crohn dargestellt.

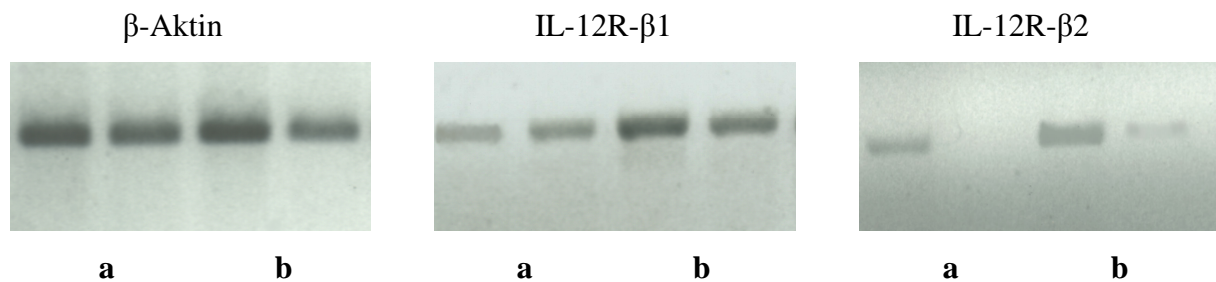


Abb. 12: RT-PCR-Transkripte mononukleärer Zellen eines Patienten mit aktiven M. Crohn aus Regionen a) nicht-entzündeter Mukosa und b) entzündeter Mukosa. [β -Aktin - 26 Zyklen, 300bp; IL-12R- β 1 - 32 Zyklen, 531bp; IL-12R- β 2 - 32 Zyklen, 472bp; Lane 1 jeweils 10 μ l cDNA, Lane 2 jeweils 2,5 μ l cDNA]

In Abbildung 13 und 14 ist das Expressionsniveau von IL-12R β 1- und IL-12R- β 2-Transkripten und die entsprechenden Medianwerte der untersuchten Patienten dargestellt.

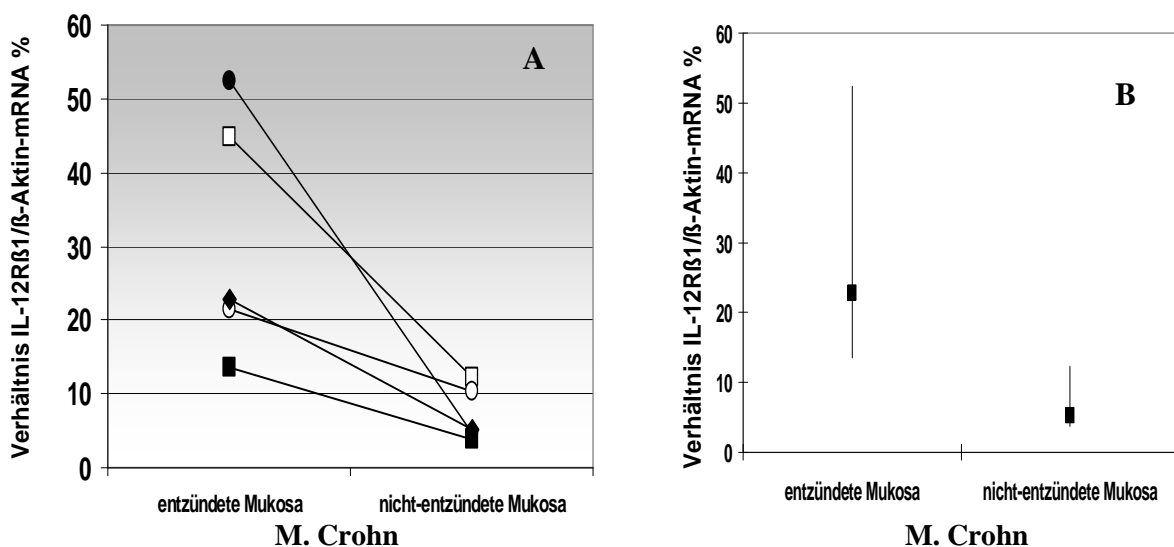


Abb. 13: A) Verhältniss IL-12R β 1/ β -Aktin-mRNA in entzündeter und nicht-entzündeter Mukosa bei Patienten mit M. Crohn. B) Darstellung der entsprechenden Medianwerte aller Patienten (n=5) in entzündeter Mukosa (= 22,8%; Min.:13,5%, Max.:52,4%) und nicht-entzündeter Mukosa (=5,2%; Min.:3,8%, Max.:12,3%).

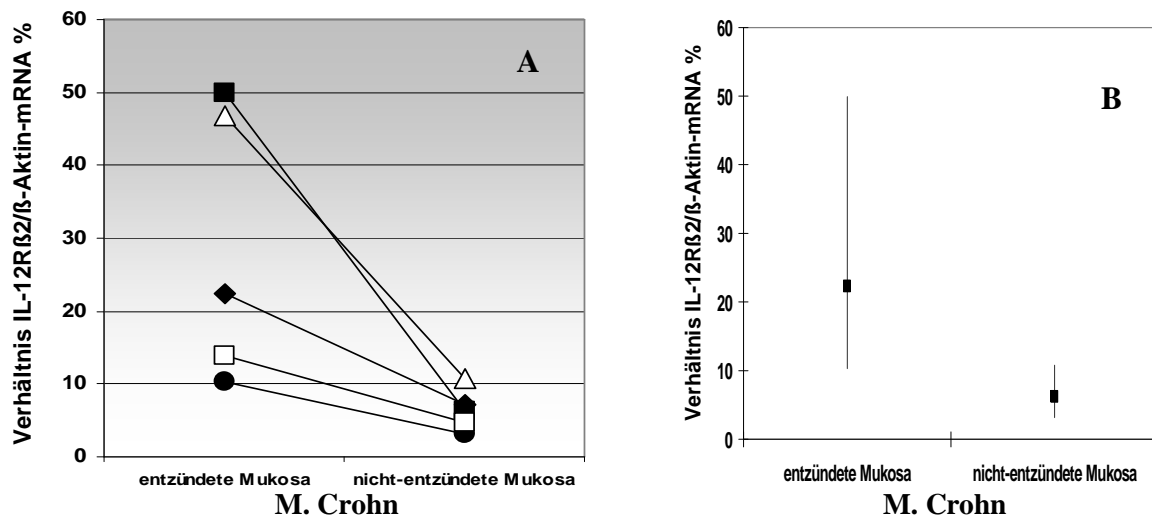


Abb. 14: A) Verhältnis IL-12Rβ2-/β-Aktin-mRNA in entzündeter und nicht-entzündeter Mukosa bei Patienten mit M. Crohn. B) Darstellung der entsprechenden Medianwerte aller Patienten (n=5) in entzündeter Mukosa (= 22,3%; Min.:10,3%, Max.:49,9%) und nicht-entzündeter Mukosa (=6,2%; Min.3,2%, Max.:10,8%).

Der intra-individuelle Vergleich der Expression von IL-12R-β1- und IL-12R-β2-Transkripten in entzündeter und nicht-entzündeter Mukosa bei Patienten mit M. Crohn, zeigte auch hier in entzündeter Mukosa eine deutliche Steigerung für beide Rezeptorketten-Transkripte um mehr als ein Dreifaches.

4.2.3.2. Vergleich der Expression des IL-12Rβ2 auf Proteinebene in entzündlich und nicht-entzündlich verändertem Gewebe bei Patienten mit M. Crohn

Eine erhöhte IL-12R-β2-Expression in entzündeter Mukosa im Vergleich zu nicht-entzündeter Mukosa bei Patienten mit M. Crohn, ließ sich auch auf Rezeptorebene bestätigen. In Abbildung 15 ist der Anteil CD3/CD4-positiver-T-Lymphozyten der Lamina propria dargestellt, die auf ihrer Oberfläche die IL-12R-β2-Untereinheit exprimieren. Es wurden die gleichen M. Crohn-Patienten (n=5) wie in 4.2.3.1. untersucht. Der Anteil IL-12R-β2-positiver Zellen betrug in entzündeter Mukosa 42% (Median) und in nicht-entzündeter Mukosa 5,8% (Median).

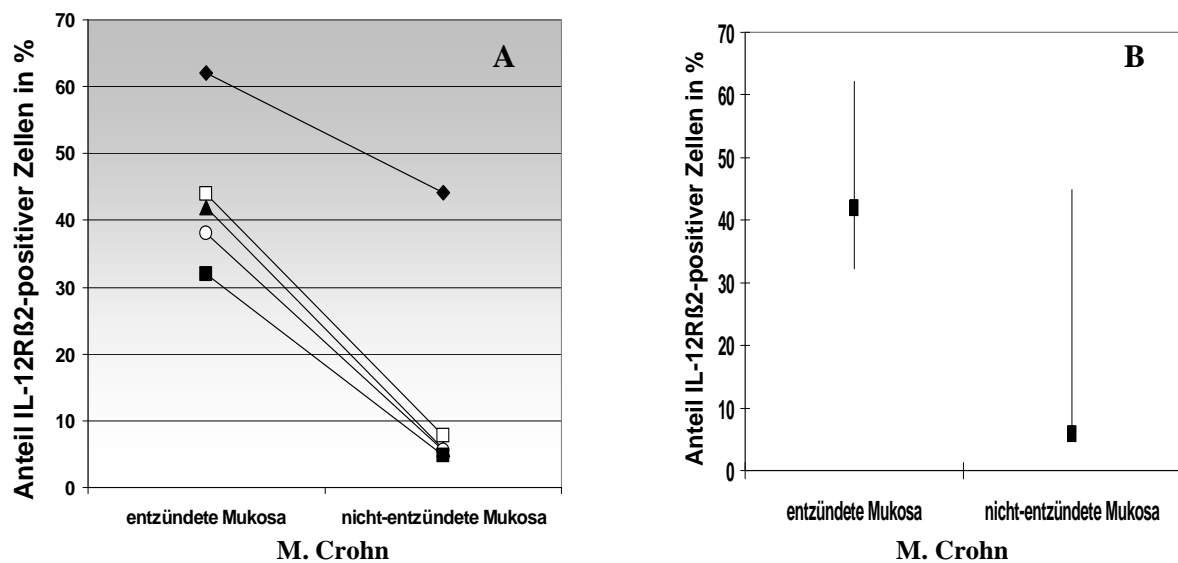


Abb. 15: FACS-Analyse: **A)** Anteil IL-12R β 2-positiver CD3/CD4⁺-Lymphozyten der Lamina propria aus paarigen Regionen von Patienten (n=5) mit einem aktiven M. Crohn. **B)** Darstellung der entsprechenden Median-Werte in entzündeter Mukosa (=42%; Min.: 32,3%; Max.: 62,1%) und nicht-entzündeter Mukosa (=5,8%; Min.: 4,8%; Max: 44,8%).

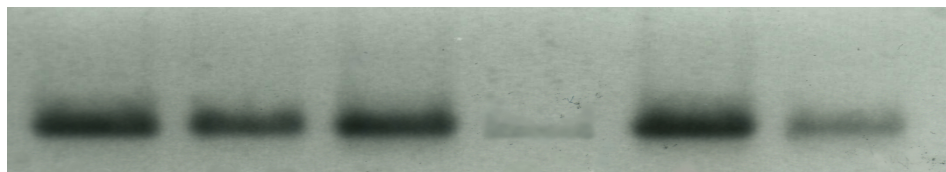
4.3. Induktion der IL-12-Rezeptoruntereinheiten durch In-vitro-Stimulationen

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Induktion der IL-12-Rezeptoruntereinheiten durch In-vitro-Stimulationen untersucht. Hierzu wurden periphere mononukleäre Zellen und Lymphozyten der Lamina propria einer gesunden Kontrollgruppe stimuliert und untersucht.

4.3.1. Induktion der IL-12R-Untereinheiten durch rh IL-12 und PHA

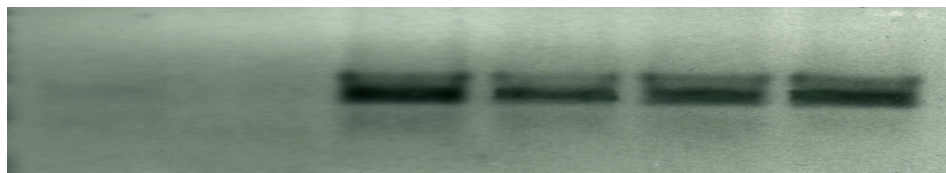
IL-12 selbst ist an der Regulation der Expression beider IL-12-Rezeptoruntereinheiten auf T-Lymphozyten beteiligt. Obwohl unstimulierte, nicht-aktivierte periphere mononukleäre Zellen prinzipiell in der Lage sind anti-IL-12R β 1-Antikörper zu binden, jedoch ist für eine hochaffine Bindung von rh IL-12 eine zusätzliche Stimulation über den T-Zellrezeptor notwendig. Dies kann durch anti-CD3-Antikörper bzw. PHA erreicht werden [CHAN et al., 1991, WU et al., 1996, WU et al. 1997, ROGGE et al., 1997, THIBODEAUX et al., 1999]. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Voraussetzung für eine IL-12-vermittelte Aktivierung von T-Lymphozyten, die Expression beider IL-12R-Untereinheiten darstellt.

Durch In-vitro-Stimulation peripherer mononukleärer Zellen gesunder Spender (n=5) mit rhIL-12 (4µg/ml) und PHA (2µg/ml) für 24h konnte eine deutliche Steigerung der Transkript-Konzentration beider IL-12R-Untereinheiten im Vergleich zu unstimulierten Zellen induziert werden. Während die Expression der IL-12R-β2-Untereinheit nach 72stündiger Stimulation nochmals deutlich zu steigern war, änderte sich das IL-12R-β1-Transkriptsniveau nicht. In Abbildung 16 bis 18 sind die RT-PCR-Transkripte eines Spenders auf mRNA-Ebene exemplarisch dargestellt.



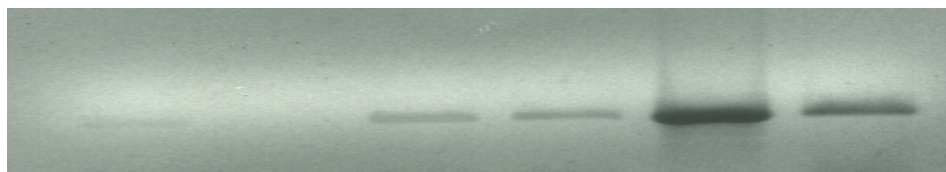
-----basal----- -----24Std.----- -----72Std.-----

Abb. 16: RT-PCR für β -Aktin-Transkripte (300bp; 26 Zyklen) nach Stimulation mit IL-12 (4µg/ml) und PHA (2µg/ml) [Lane 1: 10µl cDNA; Lane 2: 2,5µl cDNA]



-----basal----- -----24Std.----- -----72Std.-----

Abb. 17: RT-PCR für IL-12R-β1-Transkripte (531bp; 32 Zyklen) nach Stimulation mit rhIL-12 (4µg/ml) und PHA (2µg/ml) [Lane 1: 10µl cDNA; Lane 2: 2,5µl cDNA]



-----basal----- -----24Std.----- -----72Std.-----

Abb. 18: RT-PCR für IL-12R-β2-Transkripte (472bp; 32 Zyklen) nach Stimulation mit IL-12 (4µg/ml) und PHA (2µg/ml) [Lane 1: 10µl cDNA; Lane 2: 2,5µl cDNA]

Durch Fluoreszenzmarkierung beider Rezeptoruntereinheiten auf der Zelloberfläche peripherer mononukleärer Zellen (n=5) und anschließender Zytofluorometrieanalyse (siehe 3.6.1.3), konnten auf Proteinebene die gleichen Ergebnisse erhoben werden (Abb.15).

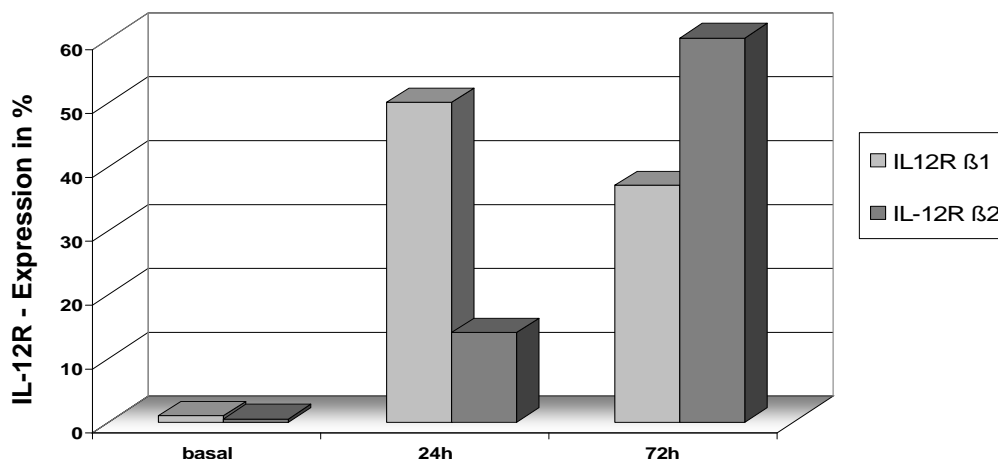


Abb. 19: Zytofluorometrieanalyse: Expression der IL-12-Rezeptor-Untereinheiten auf der Zelloberfläche peripherer CD3/CD4-positiver T-Lymphozyten gesunder Spender nach Stimulation mit rhIL-12 (4µg/ml) und PHA (2µg/ml).

4.3.2 Induktion von IL-12Rβ1- und IL-12R-β2-Transkripten in LPMNC durch In-vitro-Kostimulation mit Anti-CD3-Antikörpern und B7.1-Molekülen

Um den Einfluss einer B7.1-vermittelten Kostimulation bezüglich der IL-12R-Transkript-Expression in intestinalen Lymphozyten zu analysieren, wurden LPMNC (1×10^6 Zellen) von 7 weiteren Patienten der Kontrollgruppe durch Cross-linking mit monoklonalen anti-CD3-Antikörpern (2µg/ml), die das notwendige T-Zellrezeptor-Signal induzieren, in Anwesenheit von B7.1-positiven respektive B7.1-negativen Maus-Ltk⁻-Zellklonen ($2,5 \times 10^5$ Zellen), die den humanen CDw32/Fcγ-Rezeptor II exprimieren, stimuliert.

In Abbildung 22 bis 24 sind die mittels semiquantitativer RT-PCR ermittelten Transkripte für β-Aktin, IL-12R-β1 und IL-12R-β2 eines Patienten dargestellt.

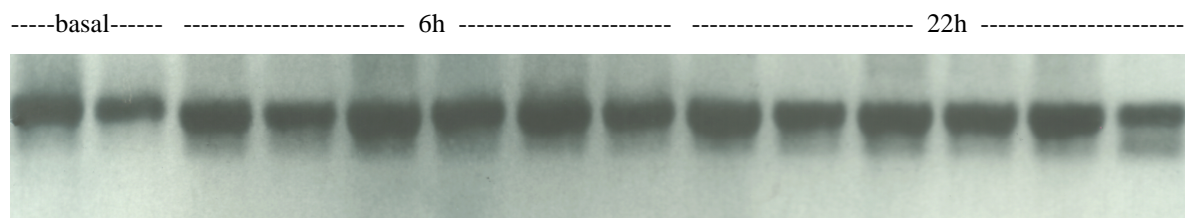


Abb. 22: RT-PCR für β-Aktin-Transkripte (300bp) mononukleärer Zellen der Lamina propria eines Patienten : 1/2 basal (10µl;2,5µl); 6h Stimulation mit 3/4 B7.1 (10µl;2,5µl); 5/6 anti-CD3 (10µl;2,5µl); 7/8 B7.1/anti-CD3 (10µl;2,5µl); 22h Stimulation mit 9/10 B7.1 (10µl;2,5µl); 11/12 anti-CD3 (10µl;2,5µl); 13/14 B7.1/anti-CD3 (10µl;2,5µl)

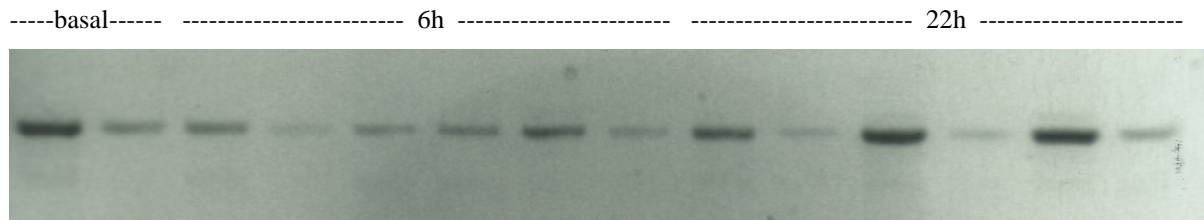


Abb. 23: RT-PCR für IL-12R- β 1-Transkripte (531bp) mononukleärer Zellen der Lamina propria eines Patienten : 1/2 basal (10 μ l;2,5 μ l); 6h Stimulation mit 3/4 B7.1 (10 μ l;2,5 μ l); 5/6 anti-CD3 (10 μ l;2,5 μ l); 7/8 B7.1/anti-CD3 (10 μ l;2,5 μ l); 22h Stimulation mit 9/10 B7.1 (10 μ l;2,5 μ l); 11/12 anti-CD3 (10 μ l;2,5 μ l); 13/14 B7.1/anti-CD3 (10 μ l;2,5 μ l)

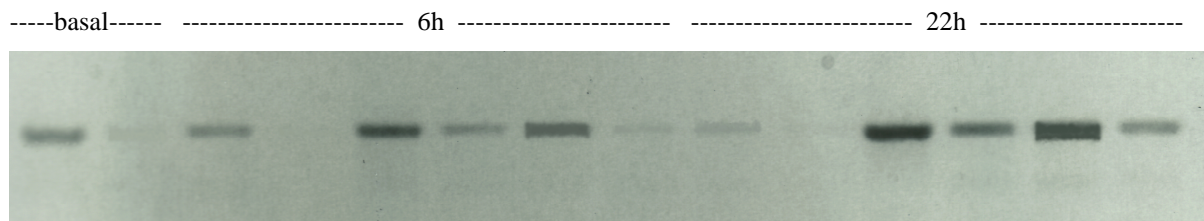


Abb. 24: RT-PCR für IL-12R- β 2-Transkripte (472bp) mononukleärer Zellen der Lamina propria eines Patienten : 1/2 basal (10 μ l;2,5 μ l); 6h Stimulation mit 3/4 B7.1 (10 μ l;2,5 μ l); 5/6 anti-CD3 (10 μ l;2,5 μ l); 7/8 B7.1/anti-CD3 (10 μ l;2,5 μ l); 22h Stimulation mit 9/10 B7.1 (10 μ l;2,5 μ l); 11/12 anti-CD3 (10 μ l;2,5 μ l); 13/14 B7.1/anti-CD3 (10 μ l;2,5 μ l)

Nach 6-stündiger In-vitro-Stimulation mononukleärer Zellen der Lamina propria konnte weder durch anti-CD3-Antikörper, membranständige B7.1-Moleküle, noch durch Kostimulation mit anti-CD3-mAk und B7.1 eine signifikante Steigerung der Transkript-Konzentration des IL-12R- β 1 beobachtet werden (Abb. 20 und 21). Auch IL-12R- β 2-mRNA-Transkripte konnten im Vergleich zu unstimulierten Zellen durch 6-stündige Stimulation mit anti-CD3-mAk in Abwesenheit von B7.1-Molekülen nicht signifikant beeinflusst werden (-19% (Median); $p=0,78$). Hier war jedoch durch 6-stündige Kostimulation mit anti-CD3-mAk und B7.1 (Abb.3) eine signifikante Erhöhung der IL-12R- β 2-Transkriptrate um 76% ($p=0,028$) im Vergleich zur Basaltranskription zu beobachten (Abb. 20 und 21).

Nach 22stündiger Stimulation intestinaler Lymphozyten mit anti-CD3-mAk konnte eine erhöhte Konzentration für IL-12R- β 1-mRNA beobachtet werden, wobei die Transkript-Konzentrationen weder durch die An- noch die Abwesenheit von B7.1-Molekülen weiter gesteigert werden konnte (Abb. 20 und 21). Im Gegensatz dazu, konnten IL-12R- β 2-Transkripte durch eine alleinige Stimulation mit anti-CD3-mAk über 22h im Vergleich zu unstimulierten Zellen nicht signifikant gesteigert werden ($p>0,05$). Allerdings konnte durch Kostimulation mit anti-CD3-mAk und B7.1 für 22h eine signifikante Steigerung um 110,4% für IL-12R- β 2-Transkripte festgestellt werden (Abb. 20 und 21).

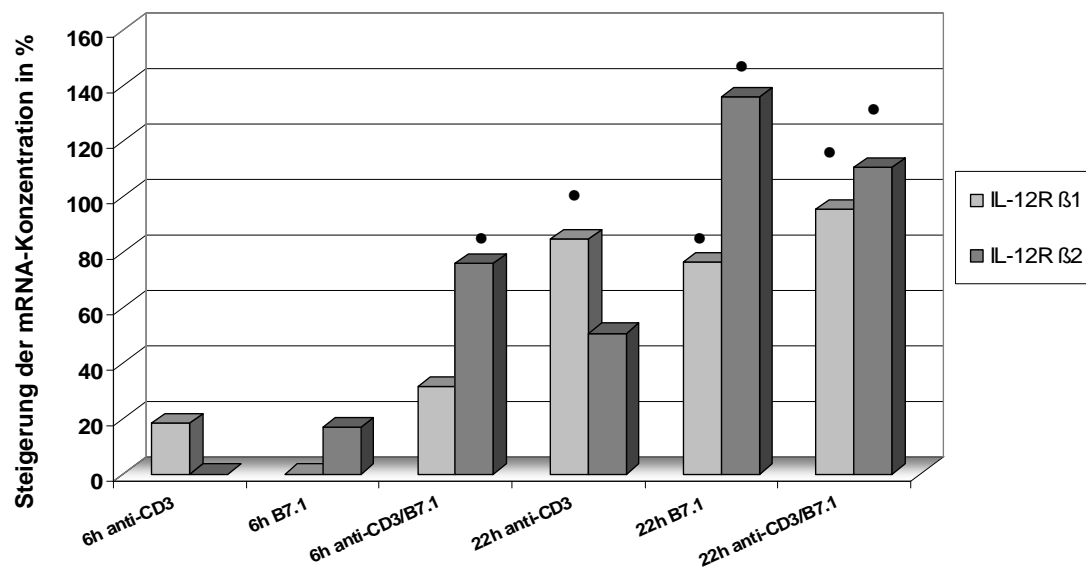


Abb. 20: IL-12R- β 1- und IL-12R- β 2-mRNA-Konzentrationen mononukleärer Zellen der Lamina propria ($n=7$) nach 6 bzw. 22stündiger Stimulation mit anti-CD3 und B7.1-Molekülen im Verhältnis zu unstimulierten Zellen. Die mit • gekennzeichneten Median-Werte zeigen eine signifikante Steigerung der Transkript-Konzentrationen im Vergleich zu unstimulierten Zellen auf ($p \leq 0,05$).

Die Ergebnisse deuten auf einen Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau der IL-12R- β 2-Transkripte intestinaler Lymphozyten der Lamina propria und der B7.1-vermittelten Kostimulation hin.

5. DISKUSSION

In den letzten Jahren haben sich unsere Erkenntnisse über die Immunpathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen enorm erweitert. Ein wesentlicher, pathogenetisch bedeutsamer Faktor besteht in der gesteigerten Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-12, $\text{INF-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ in der intestinalen Mukosa, welche die zentrale Rolle in der Ausdehnung und Aufrechterhaltung des inflammatorischen Prozesses einnehmen und das Zytokinprofil einer TH_1 -vermittelten Immunantwort widerspiegeln.

Um das Verständnis des darmassoziierten Immunsystems und den immunregulatorischen Vorgängen unter physiologischen Bedingungen, sowie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, insbesondere bezüglich der pathologischen Krankheitsaktivität TH_1 -dominanter intestinaler Erkrankungen, denen auch der Morbus Crohn zugehörig ist, weiter auszudehnen, wurde in dieser Arbeit die Expression der IL-12-Rezeptor-Untereinheiten auf mononukleären Zellen untersucht. Dazu wurden die IL-12RmRNA-Transkripte der $\beta 1$ - und der $\beta 2$ -Kette an T-Lymphozyten der Lamina propria und des peripheren Blutes bei Patienten mit einem aktiven Morbus Crohn und einer aktiven Colitis ulcerosa analysiert und mit einer Kontrollgruppe verglichen.

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit war die Entdeckung erhöhter IL-12R- $\beta 2$ -Transkript-Konzentrationen in mononukleären Zellen der Lamina propria (LPMNC) aus entzündeten Darmabschnitten bei Patienten mit M. Crohn. Diese Beobachtungen konnten weder in der Mukosa bei Patienten mit Colitis ulcerosa, noch in der Kontrollgruppe, bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom, nachgewiesen werden. In beiden Gruppen bestand kein Unterschied hinsichtlich der Expression der IL-12R- $\beta 1$ - und IL-12R- $\beta 2$ -Transskripte. Darüber hinaus konnten keine erhöhten IL-12R- $\beta 2$ -mRNA-Transkripte in nicht-entzündeten Mukosaabschnitten bei M. Crohn-Patienten nachgewiesen werden.

Der M. Crohn gehört zu den chronischen Entzündungen des Gastrointestinaltrakts und ist gekennzeichnet durch eine mukosale Infiltration mit CD4⁺-T-Zellen und Makrophagen [FIOCCHI, 1998, ZEITZ, 1997], die funktionell aktiviert sind und gesteigerte Mengen an Zytokinen, wie IFN- γ und TNF- α sezernieren, die einen TH₁-Phänotyp widerspiegeln [FAIS et al., 1991, BREESE et al., 1993, FUSS et al., 1996]. Die Theorie einer lymphozytären TH₁-Dominanz beim Morbus Crohn, wurde durch die Entdeckung erhöhter IL-12-Transkripte in der Darm-Mukosa von M. Crohn-Patienten und der folgenden Expansion IFN- γ -sezernierender Zellen erhärtet bzw. bestätigt [MONTELEONE et al., 1997, PARRONCHI et al., 1997, BERREBI et al., 1997]. In einem etablierten Tiermodell, in dem bei BALB/c- und SJL/J-Mäusen durch die rektale Gabe des Haptens TNBS (2,4,6-trinitrobenzoesulfonsäure) eine, dem M. Crohn ähnelnde, chronisch intestinale Entzündung induziert wurde, die sog. TNBS-Colitis, konnte schon frühzeitig gezeigt werden, dass die Gabe von monoklonalen anti-IL-12-Antikörpern (mAb) eine deutliche Besserung der klinischen und histopathologischen Aspekte der Erkrankung erzielt werden konnte [NEURATH et al., 1995]. In zwei weiteren Tiermodellen konnte beobachtet werden, dass bei STAT4-defizienten Mäusen die IFN- γ -Produktion durch T-Zellen deutlich beeinträchtigt ist. Darüber hinaus waren diese T-Zellen nach adoptivem Transfer in immundefiziente Mäuse nicht in der Lage, die Entwicklung einer Colitis zu fördern [SIMPSON et al., 1998, WIRTZ et al., 1999]. Wenn man diese Ergebnisse zusammenfassend betrachtet, muss man davon ausgehen, dass die Signalkette IL-12/STAT4 eine entscheidende Rolle in der Induktion von TH₁-Zellen spielt und somit in der Pathogenese der chronisch intestinalen Entzündung [PALLONE et al., 1998, MONTELEONE et al., 1999].

IL-12, ein heterodimeres, proinflammatorisch wirkendes Zytokin, stellt den Hauptinduktionsfaktor von TH₁-Zellen dar [HSIEH et al., 1993, MANETTI et al. 1993, IHLE, 1996, STERN et al, 1996, MAGRAM et al., 1996]. Es vermittelt seine Aktivität durch einen Rezeptor, der aus zwei Untereinheiten besteht, der IL-12R- β 1- und der IL-12R- β 2-Kette [PRESKY et al., 1996]. Ausschließlich die β 2-Untereinheit kann direkt mit STAT4 interagieren [YAO et al., 1999, VAN RIETSCHOTEN et al., 2000] und wird selektiv von TH₁-Zellen exprimiert [ROGGE et al., 1997, SZABO et al., 1997]. Die gesteigerte Expression des IL-12R- β 2 spiegelt die signifikant höhere T-Zellaktivierung in entzündeter Mukosa der Patienten mit M. Crohn im Vergleich zu entzündeten Arealen bei Colitis ulcerosa wider. Durch die verstärkte Expression der β 2-Kette wird die Reagibilität mukosaler T-Zellen

auf IL-12 wohl aufrechterhalten und verstärkt. Dadurch kann die Signaltransduktion über STAT4 intensiviert erfolgen und die schließlich in der Differenzierung zu TH₁-Zellen mit Sekretion des typischen Zytokinprofiles münden. Vergleichsweise analoge Daten konnten auch bei anderen TH₁-gesteuerten, granulomatösen Erkrankungen, wie der Lungentuberkulose und der Sarkoidose, erhoben werden [TAHA et al., 1999, ZHANG et al., 1999].

Die Beobachtungen der letzten Jahre, sprechen dafür, dass die intestinale Entzündung beim M. Crohn vornehmlich durch TH₁-Zellen und deren sezernierten Zytokine ausgelöst wird, wohingegen die Colitis ulcerosa durch eine phänotypische TH₂-Domianz charakterisiert ist [NIESSNER et al., 1995, FUSS et al., 1996, LAKATOS et al., 2000]. Durch die vorliegenden Daten der erhöhten IL-12R- β 2-Expression beim M. Crohn, die bei Colitis ulcerosa und der Kontrollgruppe nicht nachzuweisen war, bestätigen dieses Konzept. Zusammenfassend untermauern die erhobenen Daten die vorherrschende Meinung einer lymphozytären TH₁-Domianz beim M. Crohn.

IL-4, das Zytokin, welches für die Induktion von TH₂-Zellen verantwortlich ist, antagonisiert die Differenzierung von TH₁-Zellen, indem es die Expression der β 2-Kette des heterodimeren IL-12R herabsetzt, wodurch die Signaltransduktion von Interleukin-12 inhibiert wird. Durch die Arbeit von NISHIKOMORI et al. [2000], konnte gezeigt werden, dass eine IL-4-initiierte Differenzierung von TH₂-Zellen nicht umprogrammiert respektive verändert werden kann. Diese Daten wurden durch die Untersuchung CD4-positiver-T-Zellen IL-12R- β 2-transgener Balb/c-Mäuse und mittels TH₂-Zellklone, die mit einem IL-12R- β 2-Konstrukt transfiziert wurden, generiert. Infolgedessen wird ein festgelegtes "TH₂-Programm" gegen den Einfluss und gegen die artifizielle Expression der β 2-Untereinheit fortgeführt.

Auch wenn der Dualismus TH₁ versus TH₂ eine starke Vereinfachung der Komplexität des Immunsystems darstellt, bietet sich dadurch jedoch ein hilfreiches Betrachtungskonzept zum Verständnis der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit war der Nachweis eines In-Vitro Induktionseffektes IL-12R- β 2-Transskripte auf Lamina propria-Lymphozyten durch den kostimulatorischen Effekt von B7.1/CD28.

Der Differenzierungsprozess von CD4⁺-T-Zellen wird über die Ligation des T-Zellrezeptors initiiert, wobei dieses Signal unerlässlich, jedoch nicht ausreichend ist, um eine antigenspezifische klonale Expansion zu induzieren. Um T-Zellen zur Proliferation anzuregen, ist ein weiteres, sog. kostimulatorisches Signal notwendig. B7.1- und B7.2-Moleküle werden hierzu auf der Oberfläche verschiedener antigenpräsentierender Zellen, wie Makrophagen [FREEDMAN et al., 1991], dendritischer Zellen [YOUNG et al., 1992] und B-Zellen [LINSLEY et al., 1990] exprimiert und wirken durch Interaktion mit ihren Rezeptoren CD28 und CTLA-4 als effektive Kostimulatoren der initialen T-Zellaktivierung [FREEMAN et al., 1993, HATHCOCK et al., 1994].

Wie bereits erwähnt, ist IL-12 eines der wichtigsten Zytokine, welches das dynamische und bilaterale Wechselspiel zwischen antigenstimulierten T-Helferzellen und antigenpräsentierenden Zellen via CD40-CD40-Ligand-Interaktion vermittelt [D'ANDREA et al., 1992, SHU et al., 1995, KATO et al., 1996] und die Differenzierung CD4⁺-T-Helferzellen in Richtung TH₁-Zellen lenkt [HSIEH et al., 1993, MANETTI et al. 1993, IHLE, 1996, STERN et al., 1996, MAGRAM et al., 1996]. Die Regulation der T-Zell-Differenzierung erfolgt durch die Expression der IL-12R- β 2-Untereinheit [ZHANG et al., 1999, ROGGE et al., 1999], die selektiv auf TH₁-Zellen exprimiert wird [SZABO et al., 1997, ROGGE et al., 1997]. Neben Zytokinen, sind diese akzessorischen Moleküle auch an der Differenzierung und Proliferation aktivierter T-Helferzellen beteiligt [THOMPSON et al., 1989]. Der Synergismus von B7.1 und IL-12 fördert die Aktivierung anti-CD3-stimulierter TH₁-Klone. Abgesehen von einer gesteigerten IL-2R α -Expression [IGARASHI et al., 1996] und einer erhöhten Proliferation, wird durch dieses Zusammenspiel die IFN- γ -Produktion begünstigt [MURPHY et al., 1994]. Naive T-Zellen exprimieren ohne Stimulation weder IL-12R- β 1-, noch IL-12R- β 2-mRNA. Wenn naive T-Zellen mit hohen Dosen anti-CD3 stimuliert werden, kann man eine Akkumulation der IL-12R- β 1-mRNA beobachten, während IL-12R- β 2-Transskripte nicht induziert werden. Somit muss man vermuten, dass IL-12-Rezeptoren, die auf naiven T-Zellen nach anti-CD3-Stimulation exprimiert werden, eine niedrige Affinität für IL-12 zeigen, denn ein hoch-affiner IL-12R muss sich aus beiden Untereinheiten zusammensetzen [PRESKY et al., 1996]. Dies bestätigend, kann die Proliferation naiver

CD4⁺CD44^{low}-T-Zellen, die mit anti-CD3 stimuliert werden, durch IL-12 nicht gesteigert werden [KATO et al., 1997]. Wie gezeigt werden konnte, beteiligen sich verschiedene kostimulatorische Moleküle an der T-Zelldifferenzierung durch Regulation der IL-12-Rezeptorexpression. Nach anti-CD3-Stimulation muriner naiver T-Zellen, in Anwesenheit von B7.2-transfizierten CHO-Zellen, kann eine Akkumulation beider IL-12R- β -Untereinheiten-Transkripte und eine funktionelle Bindung von IL-12 an die Zelloberfläche beobachtet werden [IGARASHI et al., 1998]. Die TH₁-Zellproliferation durch Kostimulation mit B7.1 und IL-12 ist durch eine verstärkte IL-12R-Expression, durch die Aktivierung der IL-12-Kaskade selbst, aber auch durch die gesteigerte Expression der IL-12R- β 2-Untereinheit bedingt [KATO et al., 1997]. Auf diese Weise scheint die Ligation der kostimulatorischen Moleküle B7.1 und B7.2 an ihren Rezeptor CD28 einen entscheidenden Einfluss auf die Expression und die Funktion eines high-affinity IL-12R auf T-Zellen zu haben. In dieser Arbeit konnte eine signifikante Induktion der IL-12R- β 1- und IL-12R- β 2-Transkripte an T-Lymphozyten der Lamina propria nach Kostimulation mit anti-CD3 und B7.1-Molekülen demonstriert werden. Durch die erhöhte B7-Expression antigenpräsentierender Zellen der intestinalen Mukosa bei Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung [HARA et al., 1997], zeigen die Daten dieser Arbeit eine deutliche B7-vermittelte Interaktion zwischen T-Helfer- und antigenpräsentierenden Zellen auf. Somit muss man vermuten, dass zwischen der IL-12-vermittelten TH₁-Zellaktivierung und der Kostimulation durch B7-Moleküle ein essentieller Zusammenhang besteht.

Es ist jedoch kritisch anzumerken, dass auch bei Patienten mit Colitis ulcerosa eine gesteigerte B7-Expression in der intestinalen Mukosa vorliegt [ROGLER et al., 1997, RUGTVEIT et al., 1997]. Wie hier jedoch gezeigt werden konnte, findet sich bei Colitis-Patienten in entzündetem intestinalem Gewebe keine gesteigerte Expression der IL-12R- β 2-Transkripte. Folglich muss man davon ausgehen, dass die Rezeptor-Ligand-Interaktion von B7.1 und CD28, die IL-12R- β 2-Transkript-Expression unterstützt, jedoch nicht induziert.

Zusammenfassend betrachtet, stellt das vorherrschende TH₁-Zytokinmilieu wahrscheinlich den Hauptfaktor zur IL-12R- β 2-Induktion dar, wird jedoch vermutlich durch Kostimulation von B7.1/CD28 entscheidend gefördert.

Die erhöhte Sekretion von IL-12 und die gesteigerte Expression des high-affinity Rezeptors in entzündeten Läsionen bei Patienten mit M. Crohn, macht es vorstellbar, dass die Modulation von IL-12 via Rezeptorblockade bei TH1-vermittelten chronischen Entzündungen therapeutisch bedeutsam werden könnte. Es existieren überzeugende Daten, die in experimentellen Modellen die therapeutische Effektivität neutralisierender anti-IL12-Antikörper bei Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen demonstrieren. Aktuell beruht jedoch nur ein Therapiemodell auf der Modulation der IL-12-Rezeptorexpression: Durch Herabsetzen der IL-12R β 2-Expression mittels Quecksilberchlorid (HgCl₂), konnte bei Nagetieren eine Resistenz gegen eine experimentelle Autoimmun-Encephalitis induziert werden. Dabei handelt es sich um ein TH₁-vorherrschendes Autoimmun-Syndrom, gegen welches unbehandelte Lewis-Ratten sehr anfällig sind [GILLESPIE et al., 2000]. Des Weiteren konnte im gleichen Tiermodell durch die Blockade des IL-12-Rezeptor-Signals durch das neue anti-inflammatorisch wirkende Medikament Lysofillin (1-(5-R-Hydroxyhexyl)-3,7-dimethylxanthin) die Krankheitsaktivität reduziert werden [BRIGHT et al., 1998].

Schlussfolgernd liefern die Ergebnisse dieser Arbeit den Beweis, dass die Expression des kostimulatorischen Moleküls B7.1 einen wichtigen Mechanismus in der Regulation der β 2-Untereinheit des IL-12-Rezeptors in mukosalen Lymphozyten darstellt. Die selektive Rezeptorblockade bzw. die Herabregulation der Rezeptorexpression, könnte ein beträchtliches Potential in der therapeutischen Regulation der Immunantwort beim M. Crohn erlangen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ABBAS AK.; MURPHY KM., SHER A.: Functional diversity of helper T lymphocytes.
Nature 383, 787-793, 1996
2. ASAKURA H.; TSUCHIYA M., AISO S., WATANABE M., KOKAYASHI K., HIBI T., ANDO K., TAKATA H., SEKIGUCHI S.: Association of the human lymphocyte-DR2 antigen with japanese ulcerative colitis.
Gastroenterology 82, 413-418, 1982
3. ASQUITH P.; STOKES PL., MACKINTOSH P., HOLMES GKT, COOKE WT.:
Histocompatibility antigens in patients with inflammatory bowel disease.
Lancet 1, 113-115, 1974
4. BACON C.M.; PETRICOIN E.F. 3rd, ORTALDO J.R., REES R.C., LARNER A.C., JOHNSTON J.A., O'SHEA J.J.: Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes.
Proc Natl Acad Sci USA 92, 7307-7311, 1995
5. BANCHEREAU J.; BAZAN F., BLANCHARD D., BRIERE F., GALIZZI J.P., VAN KOOTEN C., LIU Y.J., ROUSSET F., SAELAND S. : The CD40 antigen and its ligand.
Annu Rev Immunol 12, 881-922, 1994
6. BERREBI D.; BESNARD M., FROMONT-HANKARD G., PARIS R., MOUGENOT J.F., DE LAGAUSIE P., et al.: Interleukin-12 expression is focally enhanced in the gastric mucosa of pediatric patients with Crohn`s disease.
Am J Pathol 152, 667-672, 1998

7. BREESE E.; BRAEGGER C.P., CORRIGAN C.J., WALKER-SMITH J.A.,
MACDONALD T.T.: Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal
and diseased human intestinal mucosa.
Immunology 78, 127-131, 1993
8. BRETSCHER P.; COHN.: A theory of self-nonsel self discrimination.
Science 169, 1042-1049, 1970
9. BRIGHT J.J.; DU C., COON M., SRIAM S., KLAUS S.J. : Prevention of experimental
allergic encephalomyelitis via inhibition of IL-12 signalling and IL-12 mediated Th1
differentiation: an effect of the novel anti-inflammatory drug lysofylline.
J Immunol 161, 7015-7022, 1998
10. BRUNDA M.J.: Interleukin-12
J Leukoc Biol 55, 280-288, 1994
11. CHAN S.H.; PERUSSIA B., GUPTA W., KOBAYASHI M., POSPISIL M., YOUNG H.
A., WOLF S.F., YOUNG D., CLARK S.C., TRINCHIERI G.: Induction of interferon γ
production by natiral killer cell stimukatory factor: characterization of of the responder
cells and synergy with other inducers.
J Exp Med 173, 869-879, 1991
12. CHANG T.L; SHEA C.M., URIOSTE S., THOMPSON R.C., BOOM W.H., ABBAS
A.K.: Heterogenity of helper/inducer T lymphocytes. III. Responses of IL-2 and IL-4-
Producing (Th1 and Th2) clones to antigens presented by different accessory cells.
J Immunol 145, 2801-2808, 1990
13. CHARLES O.; ELSON M.D. : Genes , microbes, and T cells - new therapeutic targets
in Crohn´s disease.
N Engl J Med 346, 614-616, 2002

14. CHIODINI R.J. ; KRUININGEN H.J.V., THAYER W.R., MERKAL R.S., COUTU J.A. :
Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified
mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease.
Dig Dis Sci 29, 1073-1079, 1984

15. CHOUAIB S.; CHEHIMI J., BANI L., GENETET N., TURSZ T, GAY F.,
TRINCHIERI G., MAMI-CHOUAIB F.: Interleukin 12 induces the differentiation of
major histocompatibility complex class I-primed cytotoxic T-lymphocyte precursors
into allospecific cytotoxic effectors.
Proc Natl Acad Sci USA 91, 12659-12663, 1994

16. CHUA A.O.; CHIZZONITE R., DESAI B.B., TRIUTT T.P., MINETTI L.J.,
WARRIER R.R., PRESKY D.H., LEVINE J.F., GATELY M.K. et al.: Expression
cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor
superfamily with strong homology to gp130.
J Immunol 153, 128-136, 1994

17. DAMLE N.K.; KLUSSMAN K., LINSLEY P.S., ARUFFO A.: Differential
costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3 and VCAM-1 on
resting and antigen-primed CD4+ T lymphocytes.
J Immunol 148, 1985-1992, 1992

18. D'ANDREA A.; RENGARAJU M., VALIANTE N.M., CHEHIMI J., KUBIN M.,
ASTE M., CHAN S.H., KOBAYASHI M., YOUNG D., NICKBARG E. et al.:
Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood
mononuclear cells.
J Exp Med 176, 1387-1398, 1992

19. DEFRANCE T.; VANBERVLIET B., BRIERE F., DURAND I., ROUSSET F.,
BANCHEREAU J.: Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to
induce anti-CD40 activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A.
J Exp Med 175, 671-682, 1992

20. DENNIG D.; LACERDA J., YAN Y., GASPARETTO C., O'REILLY R.J.: ICAM-1 (CD54) expression on B-lymphocytes is associated with their costimulatory function and can be increased by coactivation with IL-1 and IL-7.
Cell Immunol 156, 414-423, 1994
21. DESAI B.B.; QUINN P.M., WOLITZKY A.G., MONGINI P.K.A., CHIZZONITE R., GATELY M.K.: IL-12 receptor: II. Distribution and regulation of receptor expression.
J Immunol 148, 3125-3132, 1992
22. EBERT E.; ROBERTS A.: Costimulation of the CD3 pathway by CD28 ligation in human intestinal lymphocytes.
Cell Immunol 171, 211-216, 1996
23. EKBOM A.; WAKEFIELD AJ., ZACK M., ADAMI HO.: Perinatal measles infection and subsequent Crohn's disease.
Lancet 344, 508-510, 1994
24. FAIS S.; CAPOBIANCHI M.R., PALLONE F., DIMARCO P., BOIRIVANT M., DIANZANI F., TORSOLI A.: Spontaneous release of interferon gamma by intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn's disease. Kinetics of in vitro response to interferon gamma inducers.
Gut 4, 430-437, 1991
25. FIOCCHI C.: Inflammatory bowel disease: Etiology and pathogenesis.
Gastroenterology 115, 182-205, 1998
26. FOY T.M.; ARUFFO A., BAJORATH J., BUHLMANN J.E., NOELLE R.J.: Immune regulation by CD40 and its ligand gp39.
Annu Rev Immunol 15, 591-617, 1996
27. FREEDMAN A.S.; FREEMAN G.J., RYNHARDT K., NADLER L.M.: Selective induction of B7/BB-1 on interferon-gamma stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway.
Cell Immunol 137, 429-437, 1991

28. FREEMAN G.J. ; FREEDMAN A.S., SEGIL J.M., LEE G., WHITMAN J.F.,
NADLER L.M.: B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on
activated and neoplastic B cells.
J Immunol 143, 2714-2722, 1989

29. FREEMAN G.J.; BORRIELLO F., HODES R.J., REISER H., GRIBBEN J.G., NG
J.W., KIM J., GOLDBERG J.M., HATHCOCK K., LASZLO G. et al.: Murine B7-2, an
alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin
2 production.
J Exp Med 178, 2185-2192, 1993

30. FREEMAN G.J.; BOUSSIOTIS V.A., ANUMANTHAN A et al.: B7-1 and B7-2 do not
deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially
costimulates the initial production of IL-4.
Immunity 2, 523-532, 1995

31. FUSS I.J.; NEURATH M., BOIRIVANT M., KLEIN J.S., DE LA MOTTE C.,
STRONG S.A., et al.: Disparate CD4⁺ lamina propria (LP) lymphokine secretion
profiles in inflammatory bowel disease. Crohn`s disease LP cells manifest increased
secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased
secretion of IL-5.
J Immunol 157, 1261-1270, 1996

32. GAJEWSKI T.F., PINNAS M., WONG T., FITCH F.W.: Murine Th1 and Th2 clones
proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations.
J Immunol 146, 1750-1758, 1991

33. GALLI S.J.: New concepts about the mast cell.
N Engl J Med 328, 257-265, 1993

-
34. GATELY M.K.; DESAI B.B., WOLITZKY A.G., QUINN P.M., DWYER C.M., PODLASKI F.J., FAMILLETTI P.C., SINIGAGLIA F., CHIZZONITE R., GUBLER U., et al.: Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor).
J Immunol 147, 874-882, 1991
35. GATELY M.K.; RENZETTI L.M., MAGRAM J., STERN A.S., ADORINI L., GUBLER U., et al.: The interleukin-12/interleukin-12-receptor system : Role in normal and pathologic immune responses.
Annu Rev Immunol 16, 495-521, 1998
36. GILLESPIE K.M.; SZETO C.C., BETIN V.M., MATHIESON P.W.: Role of $\beta 1$ and $\beta 2$ subunits of the Interleukin-12 receptor in determining T helper 1/T helper 2 responses in vivo in the rat.
Immunology 99, 109-112, 2000
37. GREENFIELD E.; NGUYEN K., KUCHROOV.: CD28/B7 costimulation: a review.
Crit Rev Immunol 18, 389-418, 1998
38. GUBLER U.; CHUA A.O., SCHOENHAUT D.S., DWYER C.M., McCOMAS W., MOTYKA R., NABAVI N., WOLITZKY A.G., QUINN P.M., FAMILLETTI P.C., GATELY M.K.: Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor.
Proc Natl Acad Sci USA 88, 4143-4147, 1991
39. HAMPE J.; CUTHBERT A., CROUCHER P. MIRZA M.M., MASCHERETTI S., FISHER S., FRENZEL H., KING K., HASSELMAYER A., MACPHERSON A., BRIDGER S., VAN DEVENTER S., FORBES A., NIKOLAUS S., LENNARD-JONES J.E., FOELSCH U.R., KRAWCZAK M., LEWIS C., SCHREIBER S., MATHEW C.G.: Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn`s disease in German and British populations.
Lancet 357, 1925-1928, 2001

40. HARA J.; OHTANI H., MATSUMOTO T., NAKAMURA S., KITANO A.,
ARAKAWA T., et al.: Expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 in
macrophages and granulomas of Crohn's disease: demonstration of cell-to-cell contact
with T lymphocytes.
Lab Invest. 77, 175-184, 1997

41. HARRIES AD.; BAIRD A., RHODES J.: Non-smoking: a feature of ulcerative colitis.
BMJ 284, 706, 1982

42. HATHCOCK K. S.; LASZLO G., PUCILLO C., LINSLEY P., HODES R. J.:
Comparative analysis of B7.1 and B7.2 costimulatory ligands: Expression and function.
J Exp Med 180, 631-640, 1994

43. HEUFLER C.; KOCH F., STANZL U., TOPAR G., WYSOCKA M., TRINCHIERI G.,
ENK A., STEINMANN R.M., ROMAGNANI S., SCHULER G.: Interleukin-12 is
produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-
gamma production by T helper 1 cells.
Eur J Immunol 26, 659-668, 1996

44. HOU J.; SCHINDLER U., HENZEL W.J., HO T.C., BRASSEUR M., McKNIGHT S.L. :
An interleukin-4-induced transcription factor : IL-4 Stat.
Science 265, 1701-1706, 1994

45. HSIEH C.S.; MACATONIA S.E., TRIPP C.S., WOLF S.F., O'GARRA A., MURPHY
K.M.: Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced
macrophages.
Science 260, 496-497, 1993

46. HUGOT J.P.; LAURENT-PUIG P., GOWER-ROUSSEAU C., OLSON J.M., LEE J.C.,
BEAUGERIE L., NAOMI I., DUPAS J.L., VAN GOSSUM A., ORHOLM M.,
BONAITI-PELLIE C., WEISSENBAACH J., MATHEW C.G., LENNARD-JONES J.E.,
CORTOT A., COLOMBEL J.F., THOMAS G.: Mapping of a susceptibility locus for
Crohn's disease.
Nature 379, 821-823, 1996

-
47. HUGOT J.P.; CHAMAILLARD M., ZOUALI H., LEAGE S., CEZARD J.P., BELAICHE J., ALMER S., TSYK C., O`MORAIN C.A., GASSULL M., BINDER V., FINKEL Y., CORTOT A., MODIGLIANI R., LAURENT-PUIG P., GOWER-ROUSSEAU C., MACRY J., COLOMBEL J.F., SAHBATOU M., THOMAS G.: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn`s disease. *Nature* 411, 599-603, 2001
48. IGARASHI O.; YANAGIDA T., AZUMA M., OKUMURA K., NARIUCHI H.: B7-1 synergizes with IL-12 in interleukin 2 receptor α expression by mouse T helper clones. *Eur J Immunol* 26, 300-306, 1996
49. IGARASHI O.; YAMANE H., IMAJOH-OHMI S., NARIUCHI H. : IL-12 receptor (IL-12R) expression and accumulation of IL-12R β 1 and IL-12R β 2 mRNA in CD4⁺ T cells by costimulation with B7-2 molecules. *J Immunol* 160, 1638-1646, 1998
50. IHLE J.N.: STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84, 331-334, 1996
51. JACOBSON N.G., SZABO S.J., WEBER-NORDT R.M., ZHONG Z., SCHREIBER R. D., DARNELL J.E. jr., MURPHY K.M.: Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription Stat3 and Stat4. *J Exp Med* 181, 1755-1762, 1995
52. JUNE C.H.; LEDBETTER J.A., LINSLEY P.S., THOMPSON C.B.: Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 11, 211-216, 1990
53. JUNE C.H.; BLUESTONE J.A., NADLER L.M., THOMPSON C.B.: The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 15, 321-331, 1994

-
54. KATO T.; HAKAMADA H., YAMANE H., NARIUCHI H.: Induction of IL-12p40 messenger RNA expression and IL-12 production of makrophages via CD40-CD40 ligand interaction.
J Immunol 156, 3932-3938, 1996
55. KATO T.; MOROKATA T., IGARASHI O., YEE S.T., INOBE M., UEDE T., et al.: Costimulatory effect of IL-12 on the activation of naive, memory CD4⁺ T cells and Th1 clone.
Cell Immunol 176, 50-58, 1997
56. KOBAYASHI M.; FITZ L., RYAN M., HEWICK R.M., CLARK S.C., CHAN S., LOUDON R., SHERMAN F., PERUSSIA B., TRINCHIERI G.: Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes.
J Exp Med 170, 827-845, 1989
57. KOUTROUBAKIS I.; MANOUSOUS ON., MEWISSEN SGM., PENA AS. : Environmental risk factors in inflammatory bowel disease.
Hepatogastroenterology 43, 381-393, 1996
58. KUCHROO V.K.; DAS M.P., BROWN J.A., RANGER A.M. ZAMVIL S.S., SOBEL R. A., WEINER H.L., NABAVI N., GLIMCHER L.H.: B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy.
Cell 80, 707-718, 1995
59. LAKATOS L.: Immunology of inflammatory bowel diseases
Acta Physiol Hung 87, 355-372, 2000
60. LINSKENS R.K.; HUIJSDENS X.W., SAVELKOUL P.H., VANDENBROUCKE-GRAULS C.M., MEUWISSEN S.G.: The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics.
Scand J Gastroenterol Suppl 234, 29-40, 2001

61. LINSLEY P.S.; CLARK E.A., LEDBETTER J.A.: T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1.
Proc Natl Acad Sci USA 87, 5031-5035, 1990

62. LOGAN R.F.; EDMOND M., SOMERVILLE KW., LANGMAN MJS.: Smoking and ulcerative colitis.
BMJ 288, 751-753, 1984

63. MACATONIA S.E.; HOSKEN N.A., LITTON M., VIEIRA P., HSIEH C.S., CULPEPPER J.A., WYSOCKA M., TRINCHIERI G., MURPHY K.M., O'GARRA A.: Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells.
J Immunol 154, 5071-5079, 1995

64. MACDERMOTT R.P.; STENSON W.F.: Alterations of the immune system in ulcerative colitis and Crohn's disease.
Adv Immunol 42, 285-328, 1988

65. MAGRAM J.; CONNAUGHTON S.E., WARRIER R.R., CARVAJAL D.M., WU C.Y., FERRANTE J., STEWART C., SARMIENTO U., FAHERTY D.A., GATELY M.K.: IL-12 deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine response.
Immunity 4, 471-481, 1996

66. MANETTI R.; PARRONCHI P., GIUDIZI M.G., PICCINNI M.P., MAGGI E., TRINCHIERI G., ROMAGNANI S.: Natural killer cell stimulatory factor (interleukin-12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells.
J Exp Med 177, 1199-1204, 1993

67. MATULONIS U.; DOSIOU C., FREEMAN G. et al. : B7-1 is superior to B7-2 costimulation in the induction and maintenance of T cell-mediated antileukemia immunity. Further evidence that B7-1 and B7-2 are functionally distinct.
J Immunol 156, 1126-1131, 1996

68. MONTELEONE G. ; BIANCONE L., MARASCO R., MORRONE G., MARASCO O., LUZZA F., et al.: Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn`s disease intestinal lamina propria mononuclear cells.
Gastroenterology 112, 1169-1178, 1997
69. MONTELEONE G. ; MACDONALD T.T., WATHEN N.C., PALLONE F., PENDER S.L.: Enhancing Lamina propria Th1 cell responses with Interleukin 12 produces severe tissue injury.
Gastroenterology 117, 1069-1077, 1999
70. MOSMANN TR.; COFFMAN RL.: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion leads to different functional properties.
Annu Rev Immunol 7, 145-173, 1989
71. MURILLO L.; CRUSIUS J., VAN BODEGRAVEN A., ALIZADEH B., PENA A.: CARD15 gene and the classification of Crohn`s disease.
Immunogenetics 54, 59-61, 2002
72. MURPHY E.E.; TERRES G., MACATONIA S.E., HSIEH C.S., MATTSON J., LANIER L., WYSOCKA M., TRINCHIERI G., MURPHY K. O`GARRA A.: B7 and Interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon γ production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation.
J Exp Med 180, 223-231, 1994
73. NEURATH M.F.; FUSS I., KELSALL B.L., STÜBER E., STROBER W.: Antibodies to Interleukin 12 abrogate established colitis in mice.
J Exp Med 182, 1281-1290, 1995
74. NIESSNER M.; VOLK B.A.: Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR).
Clin Exp Immunol 101, 428-435, 1995

75. NISHIKOMORI R.; EHRHARDT R.O., STROBER W.: T helper type 2 cell differentiation occurs in the presence of Interleukin 12 receptor beta2 chain expression and signaling.
J Exp Med 191, 847-858, 2000

76. OGURA Y.; BONEN D.K., INOHARA N., NICOLAE D.L., CHEN F.F., RAMOS R., BRITTON H., MORAN T., KARALIUSKAS R., DUERR R.H., ACHKAR J.P., BRANT S.R., BAYLESS T.M., KIRSCHNER B.S., HANAUER S.B., NUNEZ G., CHO J.H.: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease.
Nature 411, 603-606, 2001

77. O'MORAIN C.; SEGAL A., LEVI A.: Elemental diet as a primary treatment of acute Crohn's disease: a controlled study.
BMJ 288, 1859-1862, 1984

78. OPPENSHAW P.; MURPHY EF., HOSKEN NA., MAINO V., DAVIS K., MURPHY K., O'GARRA A.: Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations.
J Exp Med 182, 1357-1367, 1995

79. PALLONE F.; MONTELEONE G.: Interleukin 12 and Th1 response in inflammatory bowel disease.
Gut 43, 735-736, 1998

80. PARRONCHI P.; ROMAGNANI P., ANNUNZIATO F., SAMPOGNARO S., BECCHIO A., GIANNARINI L., et al.: Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease.
Am J Pathol 150, 823-832, 1997

81. PFEIFFER C.; STEIN J., SOUTHWOOD S., KATELAAR H., SETTE A., BOTTOMLY K.: Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo.
J Exp Med 181, 1569- 1574, 1995

82. PODOLSKY D.K.: Inflammatory bowel disease (first of two parts).
N Engl J Med 324, 928-937, 1991

83. PRESKY D.H.; YANG H., MINETTI L.J., et al.: A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two β -type cytokine receptor subunits.
Proc Natl Acad Sci USA 93, 14002-14007, 1996

84. REIF S.; KLEIN I., ARBER N., GILATT.: Lack of association between smoking and inflammatory bowel disease in Jewish patients in Israel.
Gastroenterology 108, 1683-1687, 1995

85. ROGGE L.; BARBERIS-MAINO L., BIFFI M., PASSINI N., PRESKY D., GUBLER U., SINIGAGLIA F.: Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells.
J Exp Med 185, 825-831, 1997

86. ROGGE L.; PAPI A., PRESKY D.H., BIFFI M., MINETTI L.J., MIOTTO D., et al.: Antibodies to the IL-12 receptor β 2 chain mark human Th1 but not Th2 in vitro and in vivo.
J Immunol 162, 3926-3932, 1999

87. ROGLER G.; ANDUS T., ASCHENBRENNER E., VOGL D., FALK W., SCHÖLMERICH J., et al.: Alterations of the phenotype of colonic macrophages in inflammatory bowel disease.
Eur J Gastroenterol Hepatol 9, 893-899, 1997

88. ROMAGNANI S.: Biology of human TH1 and TH2 cells
J Clin Immunol 15, 121-129, 1995

89. ROMAGNANI S.: TH1/TH2 cells
Inflamm Bowel Dis 4, 285-294, 1999

90. RUGTVEIT J.; BAKKA A., BRANDTZAEG P.: Differential distribution of B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) costimulatory molecules on mucosal macrophage subsets in human inflammatory bowel disease (IBD).
Clin Exp Immunol 110, 104-113, 1997
91. RYAN J.J.; McREYNOLDS L.J., KEEGAN A., WANG L.H., GARFEIN E., ROTHMANN P., NELMSK., PAUL W.E.: Growth and gene expression are predominantly controlled by distinct regions of the human IL-4 receptor.
Immunity 4, 123-132, 1996
92. SARTOR R.B.: Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiologic and clinical considerations.
Gastroenterology 106, 533-539, 1994
93. SCHIEFERDECKER H.L., ULLRICH R., WEISS-BRECKWOLDT A.N., SCHWARTING R., STEIN H., RIECKEN E.O., et al. : The HML-1 antigen of intestinal lymphocytes is an activation antigen.
J Immunol 144, 2541-2549, 1990
94. SCHWARTZ R.H.: Costimulation of t-lymphocytes: The role of CD28, CTLA-4 and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy.
Cell 71, 1065-1068, 1992
95. SECRIST H.; DEKRUYFF R.H., UMETSU D.T.: Interleukin 4 production by CD4+ cells from allergic individuals is modulated by antigen concentration and antigen-presenting cell type.
J Exp Med 181, 1081-1089, 1995
96. SEDER R.A.; PAUL W.E.: Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells.
Annu Rev Immunol 12, 635-673, 1994

-
97. SHU U. ; KINIWA M., WU C.Y., MALISZEWSKI C., VEZZIO N., HAKIMI J., GATELY M., DELESPESE G. : Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction.
Eur J Immunol 25, 1125-1128, 1995
98. SIMPSON S.J. ; SHAH S., COMISKEY M., DE JONG Y.P., WANG B., MIZOGUCHI E., BHAN A.K., TERHORST C.: T Cell-mediated pathology in two models of experimental colitis depends predominantly on the interleukin12/signal transducer and activator of transcription Stat4-pathway, but is not conditional on interferon-gamma-expression by T cells.
J Exp Med 187, 1225-1234, 1998
99. STALLMACH A.; WITTIG B.M., GIESE T., PFISTER K., HOFFMANN J.C., BULFONE-PAUS S., et al.: Protection of Trinitrobenzene Sulfonic Acid-induced colitis by an interleukin2-IgG2b fusion protein in mice.
Gastroenterology 117, 866-876, 1999
100. STALLMACH A.; CARSTENS O.: Role of infections in the manifestation or reactivation of inflammatory bowel disease.
Inflamm Bowel Dis 8, 213-218, 2002
101. STERN A.S. ; PODLASKI F.J., HULMES J.D., PAN Y.-C., QUINN P.M., WOLITZKY A.G., FAMILLETTI P.C., STREMLLO D.L., TRUITT T., CHIZZONITE R., GATELY M.K.: Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells.
Proc Natl Acad Sci USA 87, 6808-6812, 1990
102. STERN A.S.; MAGRAM J., PRESKY D.H.: Interleukin-12: an integral cytokine in the immune response.
Life Sciences 58, 639-654, 1996
103. SZABO S.J.; DIGHE S., GUBLER U., MURPHY K.M.: Regulation of the interleukin (IL) -12R β 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells.
J Exp Med 185, 817-824, 1997

-
104. TAHA R.A.; MINSHALL E.M., OLIVENSTEIN R., IHAKU D., WALLAERT B., TSICOPOULOS A., et al.: Increased expression of IL-12 receptor mRNA in active pulmonary tuberculosis and sarcoidosis.
Am J Res Crit Care Med 160, 1119-1123, 1999
105. TAYLOR-ROBINSON A.W.; SMITH E.C.: Modulation of experimental blood stage malaria through blockade of the B7/CD28 T-cell costimulatory pathway.
Immunology 96, 498-504, 1999
106. THAYER WR.; COUTU JA., CHIODINI RJ., KRUIINGEN HJV., MERKAL RS.: Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. II. Mycobacterial antibodies in Crohn's disease.
Dig Dis Sci 29, 1080-1085, 1984
107. THIBODEAUX D. K.; HUNTER S. E., WALDBURGER K. E. , BLISS J. L. , TREPICCHIO J.P., SYPEK J.P., DUNUSSI-JOANNOPOULOS K., GOLDMAN J.S., LEONARD J.P.: Autocrine regulation of IL-12 receptor expression is independent of secondary IFN- γ secretion and not restricted to T and NK cells.
J Immunol 163, 5257-5264, 1999
108. THOMPSON C.B.; LINDSTEIN T., LEDBETTER J.A., KUNKEL S.L., YOUNG H.A., EMERSON S.G., LEIDEN J.M., JUNE C.H.: CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell derived lympho-kines/cytokines.
Proc Natl Acad Sci USA 86, 1333-1337, 1989
109. THOMPSON C.B.: Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T-helper cell differentiation.
Cell 81, 979- 982, 1995
110. THOMPSON N.P.; MONTGOMERY S.M., POUNDER RE., WAKEFIELD A.J.: Is measles vaccination a risk factor for inflammatory bowel disease?
Lancet 345, 1071-1074, 1995

111. TRINCHIERI G.: Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes.
Blood 84, 4008-4027, 1994
112. TYSK C.; LINDBERG E., JARNEROT G., FLODERUS-MYRHED B.: Ulcerative colitis and Crohn's disease in unselected population of monozygotic and dizygotic twins: a study of heritability and the influence of smoking.
Gut 29, 990-996, 1988
113. VAN RIETSCHOTEN J.G.I.; SMITS H.H., WESTLAND R., VERWEIJ C.L., DEN HARTONG M.T., WIERENGA E.A.: Genomic organization of the human interleukin-12 receptor β 2-chain gene.
Immunogenetics 51, 30-36, 2000
114. WANG A.M.; DOYLE M.V., MARK D.F.: Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction.
Proc Natl Acad Sci (USA) 86, 9717-9721, 1990
115. WARDLOW A.J.; MOQBEL R., KAY A.B.: Eosinophils: biology and role in disease.
Adv Immunol 60, 151-266, 1995
116. WIRTZ S.; FINOTTO S., KANZLER S., LOHSE A., BLESSING M., LEHR H.A., GALLE P.R., NEURATH M.F.: Cutting edge: Chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: Characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN- γ -producing CD4⁺ T cells that respond to bacterial antigens.
J Immunol 162, 1884-1888, 1999
117. WOLF S.F.; TEMPLE P.A., KOBAYASHI M., YOUNG D., DICIG M., LOWE L., DZIALO R., FITZ L., FERENZ C., HEWICK R.M. et al.: Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells.
J Immunol 146, 3074-3081, 1991

118. WOLF S.F.; SIEBURTH D., SYPEK J.: Interleukin 12. A key modulator of immune function.
Stem Cells 12, 154-168, 1994

119. WU C.; WARRIER R.R., CARVAJAL D. M., CHUA A.O., MINETTI L. J., CHIZZONITE R., MONGINI P.K., STERN A.S., GUBLER U., PRESKY D.H., GATELY M.K.: Biological function and distribution of human interleukin-12 receptor beta chain.
Eur J Immunol 26, 345-350, 1996

120. WU C. ; FERRANTE J., GATELY M.K., MAGRAM J.: Characterization of IL-12 receptor beta 1 chain (IL-12Rbeta1)-deficient mice: IL-12Rbeta1 is an essential component of the functional mouse IL-12 receptor.
J Immunol 159, 1658-1665, 1997

121. YAO B.B.; NIU P., SUROWY C.S., FALTYNEK C.R.: Direct interaction of STAT4 with the IL-12 receptor.
Arch Biochem Biophys 368, 147-155, 1999

122. YOUNG J.W.; KOULOVA L., SORGEL S.A., CLARK E.A., STEINMAN R.M., DUPONT B.: The B7/BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4+ T lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro.
J Clin Invest 91, 229-237, 1992

123. ZEITZ M.: Pathogenesis of inflammatory bowel disease.
Digestion 58, 59-61, 1997

124. ZEITZ M.; QUINN T.C., GRAEFF A.S., JAMES S.P.: Mucosal T cells provide helper function but do not proliferate when stimulated by specific antigen in lymphogranuloma venerum proctitis in nonhuman primates.
Gastroenterology 94, 353-366, 1988

125. ZHANG M.; GONG D., PRESKY H., XUE W., BARNES P.F.: Expression of the IL-12 receptor β 1 and β 2 subunits in human tuberculosis.
J Immunol 162, 2441-2447, 1999

7. Dank

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Stallmach für die freundliche Überlassung des Themas. Seine wohlwollende Kritik, Hilfsbereitschaft und Diskussionsbeiträge haben die vorliegende Arbeit entscheidend gefördert.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des gastroenterologischen Forschungslabors der Inneren Medizin II, insbesondere bei Frau Reinhild Goebel für die Anleitung und Unterstützung meiner Arbeit bedanken.

Ich danke auch Herrn Dr. med. Stefan Bauer für die geduldige und aufbauende Unterstützung bezüglich der stilistischen Feinarbeit meiner Arbeit.

Zuletzt und von ganzem Herzen danke ich meiner Großmutter, die mir meine beruflichen Wünsche und meinen bisherigen Lebenslauf ermöglichte.

LEBENS LAUF

Nicole Adrian, geb. Hauck

geboren am 15. November 1974 in Pirmasens

Familienstand: verheiratet

Ehegatte: Adrian Christian

Eltern: Hauck Josef
Hauck Carola, geb. Schwab

Geschwister: Hauck Manuela

Ausbildung: 1981 bis 1985
Besuch der Grundschule in Weselberg

1985 bis 1994
Besuch des Staatlichen Gymnasiums in Landstuhl

Mai 1994
Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

1995 bis 2001
Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes, Homburg

Februar 1999 bis Februar 2001
Experimenteller Teil der Dissertation

Oktober 2001
Abschluss des Humanmedizinstudiums mit dem dritten Staatsexamen

01. Januar 2002 bis 30. Juni 2003
Ausbildung als Ärztin im Praktikum in der Medizinischen Klinik I der
Universitätskliniken des Saarlandes, Direktor: Prof. M. Pfreundschuh

seit 01. Juli 2003
Beschäftigung als Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik I der
Universitätskliniken des Saarlandes, Direktor: Prof. M. Pfreundschuh